PHARMAKOKINETIK UND METABOLISMUS HALOGENIERTER ÄTHYLENE

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Johannes Georg Michael Filser
aus München
1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536516_0046

PHARMAKOKINETIK UND METABOLISMUS

HALOGENIERTER ÄTHYLENE

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Johannes Georg Michael Filser
aus München
1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 18.5.1979

Dekan : Prof. Dr. M. Hanack

1. Berichterstatter : Prof. Dr. Dr. H.M. Bolt

2. Berichterstatter : Prof. Dr. U. Weber

Die Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. H.M. Bolt am Institut für Toxikologie der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Dr. Bolt danke ich für die Überlassung des Themas und für die freundliche Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Diskussion der Versuche. Allen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe gebührt mein besonderer Dank.

Herrn Dr. A. Buchter, Köln, und Herrn Dr. C.P. Siegers, Lübeck, möchte ich für ihre Unterstützung und Zusammenarbeit danken. Wertvolle Diskussionen lieferten Dr. B. Hering, Würzburg und Dr. H. Kappus, Düsseldorf. Für ihre wertvolle technische Unterstützung bin ich Frau L. Hering und den Herren K. Kimmich, M. Wiegand und Tje-Sien Lou zu Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. H. Remmer danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
	Abkürzungen	1
1.	EINLEITUNG	4
1.1.	Metabolismus und metabolische Aktivierung von Vinylchlorid	4
1.2.	Reaktivität und Toxizität halogenierter Äthylene	7
1.3.	Quantitative Probleme des Metabolismus halogenierter Äthylene	9
1.4.	Aufgabenstellung	9
2.	MATERIAL UND METHODEN	11
2.1.	Chemikalien	11
2.2.	Untersuchungen am Menschen	13
2.3.	Tiermaterial	13
2.3.1.	Vorbehandlung der Tiere	14
2.3.2.	Exposition der Tiere	14
2.4.	Dosierung der halogenierten Kohlenwasserstoffe in das Expositionssystem	19
2.4.1.	Berechnung der Flüssigkeitsmenge	19
2.4.2.	Zugabe reiner Gase in das Expositionssystem	20
2.4.3.	Zugabe von Dampf-Luft-Gemischen in das Expositionssystem	22
2.5.	Gaschromatographische Analyse	23
2.6.	Massenspektrometrie	24
2.7.	Radioaktivitätsmessung	24
2.7.1.	Bestimmung von radioaktiven Metaboliten im Urin	24
2.7.2.	Bestimmung von irreversibel an Protein gebundenen radioaktiven Metaboliten	25
2.8.	Untersuchungen in vitro	26
2.8.1.1.	Präparation der Lebermikrosomen	26
2.8.1.2.	Proteinbestimmung	27

Seite

2.8.2. Inkubationsapparatur 28

2.8.3. Inkubationen mit Lebermikrosomen 30

2.8.3.1. Allgemeine Inkubationsbedingungen 30

2.8.3.2. Aufnahme radioaktiver Gase in Lebermikrosomen 31

2.8.3.3. Alkylierung von mikrosomalem Protein durch radioaktive Metaboliten 31

2.8.3.4. Alkylierung von zugegebenem löslichem Protein durch radioaktive Metaboliten von [1,2-^{14}C]-Vinylbromid 32

2.8.3.5. Inkubationen mit zugesetzten Hemmstoffen der mischfunktionellen Oxidase 33

2.9. Pharmakokinetische Analyse 33

2.9.1. Gasaufnahme in den Organismus bis zum Gleichgewicht mit der umgebenden Atmosphäre (Gleichgewichtseinstellung) 35

2.9.1.1. Bestimmung der kinetischen Parameter 40

2.9.2. Metabolismus 42

3. ERGEBNISSE 45

3.1. Pharmakokinetik halogenierter Äthylene bei der Ratte 45

3.1.1. Abnahme der Gaskonzentrationen halogenierter Kohlenwasserstoffe im Expositionssystem 45

3.1.1.1. Vinylidenfluorid 47

3.1.1.2. Vinylfluorid 49

3.1.1.3. Vinylchlorid 52

3.1.1.4. Vinylbromid 55

3.1.1.5. Vinylidenchlorid 58

3.1.1.6. trans-1,2-Dichloräthylen 61

3.1.1.7. cis-1,2-Dichloräthylen 63

3.1.1.8. Trichloräthylen 66

3.1.1.9. Perchloräthylen 69

3.1.1.10. Methylchloroform (Vergleichssubstanz) 71

3.1.1.11. Tetrachlorkohlenstoff (Vergleichssubstanz) 73

		Seite
3.1.1.12.	Reproduzierbarkeit der Messungen	76
3.1.2.1.	Gleichgewichtseinstellung zwischen Gasraum und Organismus	77
3.1.2.2.	Beziehung zwischen physikalischen Eigenschaften und den Verteilungsgleichgewichten der untersuchten Kohlenwasserstoffe	81
3.1.3.	Metabolische Elimination der halogenierten Äthylene	82
3.1.3.1.	Entwicklung des Vinylchlorid-metabolisierenden Systems bei der neugeborenen Ratte	85
3.1.4.	Ausscheidung radioaktiver Metabolite von Vinylchlorid, Trichloräthylen, Vinylbromid und Tetrachlorkohlenstoff im Urin der Ratte	88
3.1.5.	Hemmung des Metabolismus halogenierter Kohlenwasserstoffe durch Inhibitoren der mikrosomalen mischfunktionellen Oxidase	93
3.2.	Verteilung halogenierter Äthylene und ihrer Metabolite in den Organen der Ratte	97
3.2.1.	Verteilung von nicht metabolisiertem Vinylchlorid und Vinylbromid	97
3.2.2.	Irreversible Proteinbindung von Metaboliten halogenierter Kohlenwasserstoffe in verschiedenen Organen	99
3.2.3.	Irreversible Proteinbindung von Vinylchlorid-Metaboliten in der Leber der Ratte	102
3.3.	Untersuchungen in vitro	104
3.3.1.	Aufnahme und kovalente Proteinbindung von [1,2-^{14}C]-Vinylbromid in Lebermikrosomen	104
3.3.1.1.	Aufnahme in die Mikrosomensuspension und irreversible Bindung von Metaboliten an mikrosomales Protein	104
3.3.1.2.	Alkylierung von zugegebenem löslichem Protein in vitro durch radioaktive Metaboliten von [1,2-^{14}C]-Vinylbromid	107
3.3.1.3.	Hemmung des Metabolismus von Vinylbromid	108
3.3.1.4.	Unterschiedliche Metabolisierung von Vinylbromid durch Lebermikrosomen verschiedener Rattenstämme	110

Seite

3.3.2. Hemmung des mikrosomalen Metabolismus von ^{14}C-Tetrachlorkohlenstoff durch Dithiocarb 112

3.4. Bildung von Aceton bei der Ratte in vivo unter der Einwirkung halogenierter Äthylene 117

4. DISKUSSION 123

4.1. Pharmakokinetisches Modell 123

4.2. Metabolische Aspekte 124

4.3. Irreversible Bindung von Metaboliten halogenierter Äthylene an makromolekulare Substanzen 127

4.4. Bildung von Aceton unter Einwirkung halogenierter Äthylene auf den Organismus der Ratte 130

5. ZUSAMMENFASSUNG 133

6. LITERATURVERZEICHNIS 136

Abkürzungen

a, b	Proportionalitätsfaktoren der Dimension cm/h; sie sind der Anzahl der durch eine Oberfläche in den Organismus bzw. aus ihm heraus diffundierenden Gasteilchen proportional
$C_{L(t)}$	Konzentration eines Gases im Luftraum des Expositionssystems zur Zeit t; [ppm]
$C_{L(O)}$	Anfangskonzentration eines Gases im Luftraum des Expositionssystems zur Zeit t = O; [ppm]
$C_{L(fO)}$	"Fiktive Anfangskonzentration" eines Gases zur Zeit t = O; [ppm]
$C_{T(t)}$	Konzentration eines Gases im tierischen Organismus zur Zeit t; [ppm = nl Gas/ml Gewebsvolumen]
$C_{T(\infty)}$	Konzentration eines Gases im Organismus zu einem Zeitpunkt nach Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes bei vollständig gehemmtem Organismus; [ppm = nl Gas/ml Gewebsvolumen]
$C_{T(t)id}$	Konzentration eines Gases im Organismus zur Zeit t, bei konstanter Gaskonzentration im Luftraum; [ppm]
$C_{xT(t)id}$	zur Zeit t in einem Tier vom Volumen V_x vorhandene Gaskonzentration, bei konstanter Konzentration des Gases im Luftraum; [ppm]
$C^{+}_{L(O)}$	Konzentration eines radioaktiv markierten Gases im Luftraum des Expositionssystems zur Zeit t = O; [dpm/ml Luft]
$C^{+}_{L(Gl)}$	Konzentration eines radioaktiv markierten Gases im Luftraum des Expositionssystems zum Zeitpunkt der Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes; [dpm/ml Luft]
$C^{+}_{L(t>Gl)}$	Konzentration eines radioaktiv markierten Gases im Luftraum des Expositionssystems zu einer Zeit nach dem Zeitpunkt der Gleichgewichtseinstellung bei nicht gehemmtem Metabolismus; [dpm/ml Luft]
CCl_4	Tetrachlorkohlenstoff
Cl	Clearance der metabolischen Eliminierung des jeweiligen Äthylens im Bereich der Kinetik erster Ordnung; [ml/h]
cis-DCE	cis-1,2-Dichloräthylen
trans-DCE	trans-1,2-Dichloräthylen

F	Schmelzpunkt [°C]
G_T	Tiergewicht [g]
k	Geschwindigkeitskonstante des Diffusionsprozesses der Aufnahme eines Gases aus der Atmosphäre in den Organismus; [1/h]
k_{12}	Geschwindigkeitskonstante des Partialprozesses der Diffusion eines Gases in den Organismus; [1/h]
k_{21}	Geschwindigkeitskonstante des Partialprozesses der Diffusion eines Gases aus dem Organismus in die Atmosphäre; [1/h]
$k_{12} \cdot V_L$	Clearance des Partialprozesses der Diffusion eines Gases in den Organismus; [ml/h]
$k_{21} \cdot V_T$	Clearance des Partialprozesses der Diffusion eines Gases aus dem Organismus in die Atmosphäre; [ml/h]
k'	Geschwindigkeitskonstante der Eliminierung eines Gases aus dem Luftraum des Expositionssystems im Bereich der Kinetik erster Ordnung; [1/h]
K_{Gl}	"Gleichgewichtskonstante", "Verteilungskonstante" des Konzentrationsgleichgewichtes zwischen Gasraum und Organismus
Kp	Siedepunkt; [°C]
Mg	Molekulargewicht
N_L	Teilchenzahl eines Gases im Luftraum des Expositionssystems
N_T	Teilchenzahl eines Gases im Organismus
Per	Perchloräthylen (1,1,2,2-Tetrachloräthylen)
ppm	gebräuchliche technische Maßeinheit für Gaskonzentrationen (= "parts per million")
r	Korrelationskoeffizient
$RM_{(t>Gl)}$	Radioaktivitätsmenge, die bis zu einer Zeit t> der Zeitpunkt der Gleichgewichtseinstellung metabolisiert wurde
Sp	"Sättigungspunkt" = die kleinste noch zur Sättigung des metabolisierenden Enzymsystems ausreichende Konzentration eines gasförmigen halogenierten Äthylens in der Atmosphäre; [ppm]

Sp_G	"Sättigungspunkt im Gewebe" = die kleinste noch zur Sättigung des metabolisierenden Enzymsystems ausreichende Konzentration eines halogenierten Äthylens im tierischen Organismus; [nmol/ml Gewebsvolumen]
Tri	1,1,2-Trichloräthylen
v_{max}	maximale Geschwindigkeit der metabolischen Elimination eines Fremdstoffes; [µmol/h]
$v_{(t)}$	Geschwindigkeit der metabolischen Eliminierung einer Substanz zur Zeit t; [µmol/h]
v'_{max}	maximale Geschwindigkeit der Elimination eines Gases aus dem Luftraum des Expositionssystems; [µmol/h]
$v'_{(t)}$	Geschwindigkeit der Elimination eines Gases aus dem Luftraum des Expositionssystems zur Zeit t; [µmol/h]
V_{fl}	Volumen einer Flüssigkeit; [ml]
V_i	imaginäres Verteilungsvolumen; [ml]
V_L	Volumen des Luftraumes im Expositionsgefäß; [ml]
V_T	Volumen der Tiere; [ml]
V_x	frei gewähltes Tiervolumen; [ml]
V'	Molvolumen eines idealen Gases bei 25°C; [ml]
V'_{fl}	Molvolumen einer Flüssigkeit; [ml]
VBr	Vinylbromid (Monobromäthylen)
VCl	Vinylchlorid (Monochloräthylen)
VCl_2	Vinylidenchlorid (1,1-Dichloräthylen)
VF	Vinylfluorid (Monofluoräthylen)
VF_2	Vinylidenfluorid (1,1-Difluoräthylen)
Ø	Grenzflächenfaktor der Dimension cm^2; ist einer Oberfläche proportional
POPOP	2,2'-p-Phenylenbis(5-phenyloxazol)
PPO	2,5-Diphenyloxazol

1. EINLEITUNG

1.1. Metabolismus und metabolische Aktivierung von Vinylchlorid

Vinylchlorid galt für lange Zeit als relativ untoxische Substanz. Erst die umfassenden Tierversuche von Maltoni und Lefemine (1974), sowie die zu gleicher Zeit erhobenen epidemiologischen Befunde an Arbeitern der Vinylchlorid verarbeitenden Industrie haben gezeigt, daß Vinylchlorid unter die Reihe der kanzerogenen Stoffe einzuordnen ist.

Diese kanzerogene Wirkung gab Anlaß für umfangreiche toxikologische und biochemische Untersuchungen an Vinylchlorid und seinen Analogen. Die Untersuchungen von Maltoni (Maltoni et al., 1974; Maltoni, 1977) haben gezeigt, daß die Karzinogenität von Vinylchlorid in erster Linie auf die Sinusoidalzellen der Leber gerichtet ist. In Tierversuchen (Maltoni, 1977) wurde ferner gezeigt, daß ein karzinogenes Potential von Vinylchlorid auch gegenüber den Hepatozyten nachweisbar ist. Werden neugeborene Ratten gegenüber Vinylchlorid exponiert, so werden in erster Linie hepatozelluläre Tumoren gefunden; bei Exposition erwachsener Ratten finden sich Hämangioendotheliome, die von den Sinusoidalzellen der Leber ausgehen.

Schaffner (1978) stellte daraufhin die Hypothese auf, daß innerhalb der Leberparenchymzelle Vinylchlorid zu reaktiven Metaboliten verstoffwechselt wird, die zum Teil den Hepatozyten verlassen und auf benachbarte Sinusoidalzellen einwirken können. Nach den vorliegenden biochemischen Befunden muß angenommen werden, daß der Metabolismus von Vinylchlorid in erster Linie am endoplasmatischen Reticulum der Leberparenchymzelle erfolgt.

Der Metabolismus von Vinylchlorid wurde von den Arbeitsgruppen um Hathway, Gehring, Henschler und Norpoth untersucht (Hefner et al., 1975; Radwan und Henschler, 1975;

Green und Hathway, 1975; Müller und Norpoth, 1975; Müller et al., 1976; Norpoth et al., 1976; Watanabe et al., 1976 a; Watanabe et al., 1976 b; Green und Hathway, 1977).

Abb. 1 gibt die derzeitigen Vorstellungen zusammenfassend wieder.

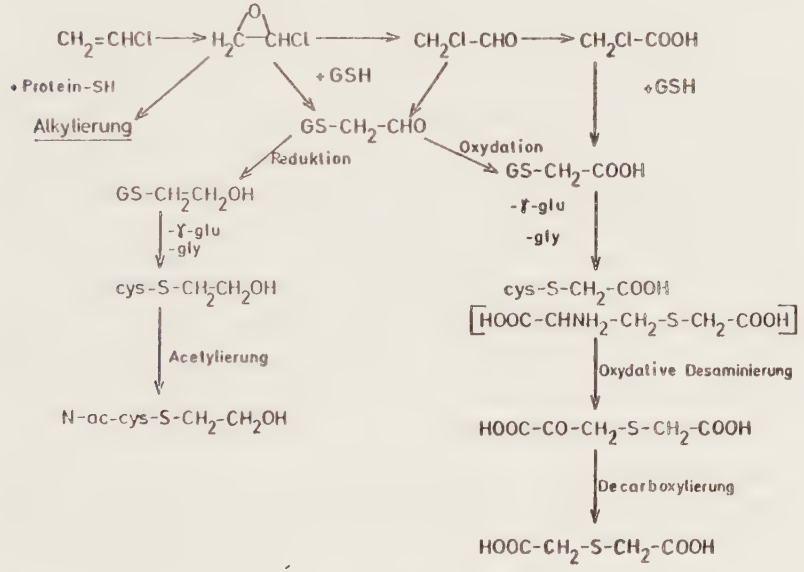


Abb. 1: Metabolismus von Vinylchlorid (nach Green und Hathway, 1977)

Vinylchlorid wird zunächst durch eine Monooxigenase des endoplasmatischen Reticulums der Leberzelle zum entsprechenden Epoxid (Chloräthylenoxid, Chloroxiran) umgesetzt. Dieses Epoxid ist reaktionsfähig und kann einerseits mit nukleophilen funktionellen Gruppen von Makromolekülen reagieren. Dieser Reaktionsmöglichkeit kommt für die Toxikoligie des Vinylchlorid eine außerordentliche Bedeutung zu. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Reaktion des Epoxids mit Glutathion (GSH). Der größte Teil des entstandenen Epoxids dürfte sich zu Chloracetaldehyd umlagern, das durch eine Aldehydoxidase zu Chloressigsäure weiteroxidiert wird. Ein geringer Teil der gebildeten Chloressigsäure wird renal eliminiert, der Hauptteil wird jedoch durch eine entsprechende Glutathiontransferase unter Cl^--Elimination an Glutathion gebunden. Das entstandene Glutathionderivat wird in einer Reihe von Folgereaktionen weiter umgesetzt, wobei als Hauptmetabolit im Urin schließlich Thiodiessigsäure ("Thiodiglycolsäure") ausgeschieden wird. Eine Nebenreaktion der Glutathionkonjugate führt zu N-Acetyl-S-hydroxyäthylcystein (siehe Abb. 1).

Barbin und Mitarbeiter (Barbin et al., 1975) stellten die Hypothese auf, daß durch Chloracetaldehyd Nucleinsäuren alkyliert werden, wobei aus Adenin-Resten von DNS bzw. RNS $1\text{-}N^6$-Atheno-adenin-Reste entstehen. In neueren Arbeiten aus unserem Institut konnte diese Auffassung bestätigt werden (Kappus et al., 1976; Laib und Bolt, 1977 a, b; Laib und Bolt, 1978). Es ist anzunehmen, daß der Alkylierung von DNS durch einen reaktiven Vinylchlorid-Metaboliten (Chloräthylenoxid) im Hinblick auf die chemische Kanzerogenese durch Vinylchlorid eine sehr große Bedeutung zukommt (Popper, 1978).

1.2. Reaktivität und Toxizität halogenierter Äthylene

In bakteriellen Testsystemen ("Ames-Test") wie auch in Testsystemen, die Zellkulturen enthielten, zeigte Vinylchlorid eine stark mutagene Wirkung, wenn im in-vitro-Ansatz Lebermikrosomen und NADPH als metabolisierende Komponenten vorhanden waren (Rannug et al., 1974; Bartsch et al., 1975; Bartsch und Montesano, 1975; McGann et al., 1975; Malaveille et al., 1975; Greim et al., 1975; Garro et al., 1976; Hussain und Osterman-Golkar, 1976; Rannug et al., 1976; Huberman et al., 1975; Loprieno et al., 1976). Von den Vinylchlorid-Analogen zeigten Vinylidenchlorid (1,1-Dichloräthylen) sowie Trichloräthylen eine wenn auch schwächere mutagene Wirkung im gleichen Testsystem (Greim et al., 1975). Nach diesen Befunden und weiteren biochemischen Untersuchungen (Bonse et al., 1975) stellten Henschler und Mitarbeiter die folgende Strukturregel für die Mutagenität chlorierter Äthylene auf (Bonse und Henschler, 1976; Henschler und Bonse, 1977):

Sämtliche chlorierten Äthylene werden über die entsprechenden Epoxide abgebaut. Aus den Epoxiden entstehen chlorierte Aldehyde bzw. Acylchloride (Abb. 2). Im Urin erscheinen als mögliche Metabolite chlorierte Äthanol- bzw. chlorierte Essigsäurederivate.

Die mutagene bzw. kanzerogene Wirkung des jeweiligen Chloräthylens hängt nach der Theorie von Henschler und Mitarbeitern in erster Linie von der Stabilität bzw. Reaktivität des zur Diskussion stehenden Epoxids ab. Symmetrische Halogensubstitution stabilisiert das Epoxid, während unsymmetrische Halogensubstitution wie im Falle der Epoxide von Vinylchlorid, Vinylidenchlorid und Trichloräthylen zu einer erhöhten Reaktivität führt. Diese Reaktivität gilt auch für die Reaktion mit funktionellen Gruppen von Nukleinsäuren und führt zur mutagenen Wirkung in bakteriellen Testsystemen bzw. zu möglicher Kanzerogenität.

Die Analyse von Henschler und Mitarbeitern zeigt, daß ver-

gleichende Betrachtungen über die toxische Wirkung halogenierter Äthylene nicht ohne eingehende Kenntnisse des Metabolismus möglich sind.

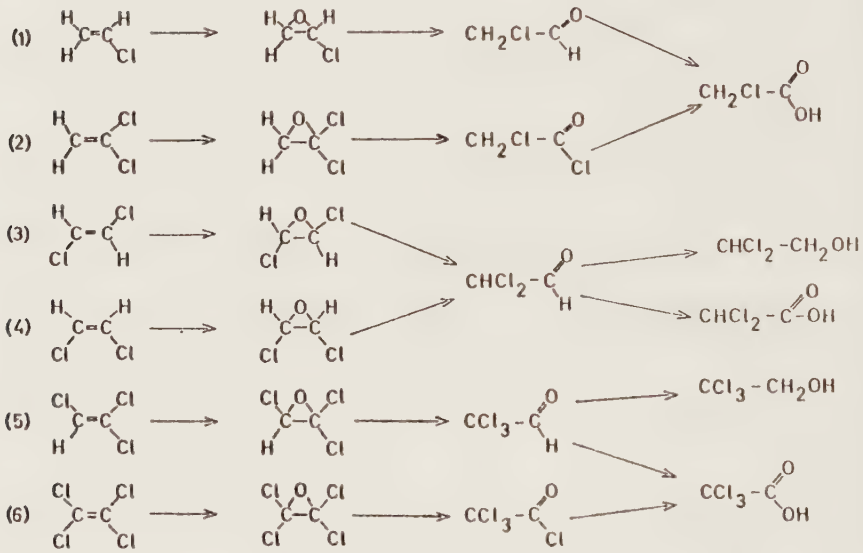


Abb. 2: Vergleich des Metabolismus chlorierter Äthylene (nach Bonse und Henschler, 1976)
1: Vinylchlorid; 2: Vinylidenchlorid; 3: trans-Dichloräthylen; 4: cis-Dichloräthylen; 5: Trichloräthylen; 6: Perchloräthylen

1.3. Quantitative Probleme des Metabolismus halogenierter Äthylene

Üblicherweise wird in Pharmakologie und Toxikologie davon ausgegangen, daß die biologische Wirkung eines Fremdstoffes durch den Stoff selbst ausgeübt wird. Nach den obigen Ausführungen müssen jedoch alle Dosis-Wirkungsüberlegungen zur Mutagenität bzw. Kanzerogenität halogenierter Äthylene berücksichtigen, daß erst ein Metabolit (das gebildete Epoxid) diese toxischen Wirkungen einleitet.

Die Wichtigkeit dieser Betrachtungen wird durch die jüngsten Arbeiten von Gehring und Mitarbeitern unterstrichen. Diese Autoren (Gehring et al., 1977; Gehring et al., 1978) zeigten, daß die Metabolisierungsgeschwindigkeit von Vinylchlorid bei der Ratte dosisabhängig ist. Da der Vinylchloridmetabolismus auch in vivo ein sättigbarer Prozeß ist, können "lineare" pharmakokinetische Analysen, die für die einzelnen Partialprozesse Kinetiken erster Ordnung zu Grunde legen, nur bis zu einem bestimmten Dosisbereich Gültigkeit besitzen, in dem Sättigung eintritt. Gehring und Mitarbeiter (Gehring et al., 1978) konnten zeigen, daß Vinylchloridkonzentrationen oberhalb von etwa 250 ppm stets den kanzerogenen Effekt besitzen, den auch bereits eine Vinylchloridkonzentration von 250 ppm ausübt; unterhalb von 250 ppm findet sich ein normales Dosis-Wirkungsverhältnis zwischen Vinylchlorid-Exposition und kanzerogener Wirkung.

1.4. Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit soll die Pharmakokinetik sämtlicher verfügbarer halogenierter Äthylene vergleichend untersucht werden. Insbesondere sollen die Faktorem aufgezeigt werden, die für das Verteilungsverhalten dieser Stoffe und die Geschwindigkeit ihres Metabolismus ausschlaggebend sind.

Im Vergleich zu bereits erarbeiteten Befunden zur Entstehung reaktiver Metabolite von Vinylchlorid und Trichloräthylen in vitro sollen ferner Untersuchungen beschrieben werden, die das Entstehen eines reaktiven Metaboliten auch im Falle des Vinylbromid beweisen.

Als Nebenbefund wird nach Exposition gegenüber verschiedenen halogenierten Äthylenen eine vermehrte Abatmung von Aceton bei der Ratte beschrieben. Dies kann zu weiteren experimentellen Arbeiten Anlaß geben.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Chemikalien

Radioaktive Kohlenwasserstoffe:

Vinylchlorid: [1,2 - ^{14}C] spez. Radioaktivität 10,7 mCi/mmol, mit Helium überlagert, Vinylbromid: [1,2 - ^{14}C], spez. Radioaktivität 10 mCi/mmol, mit Helium überlagert	Synthese der Farbwerke Hoechst AG, Radiochemische Abteilung, Frankfurt/Main
Trichloräthylen: [1,2 - ^{14}C], spez. Radioaktivität 1,7 mCi/mmol	New England Nuclear, Boston, Mass.
Tetrachlorkohlenstoff: [^{14}C], spez. Radioaktivität 6,94 mCi/mmol	Radiochemical Centre, Amersham, England

Nichtradioaktive Kohlenwasserstoffe:

Vinylidenfluorid, Vinylfluorid, Vinylchlorid	Dynamit Nobel AG, Troisdorf
Vinylbromid, Vinylidenchlorid, trans-1,2-Dichloräthylen, Methylchloroform, Perchloräthylen	Aldrich Europe, Brüssel
cis-1,2-Dichloräthylen	Ferak, Berlin
Trichloräthylen, Tetrachlorkohlenstoff	Merck AG, Darmstadt

Weitere Chemikalien:

Disulfiram (Antabus®)	E. Tosse & Co. mbH, Hamburg
Dithiocarb (Natriumdiäthyldithiocarbamat)	Merck AG, Darmstadt
SKF 525 A	Smith, Kline & French, Philadelphia, Pa.
Cremophor EL	BASF, Ludwigshafen
Maleinsäurediäthylester	Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu-Ulm
Oxisorb®	Messer Griesheim, Griesheim
Atemkalk Drägersorb®	Dräger, Lübeck
Atemkalk Sodasorb®	ICI Pharma Arzneimittelwerk, Plankstadt

Freundlicherweise wurden uns überlassen:

5-Nitro-1,2,3-benzothiadiazol, 5,6-Dimethyl-1,2,3-benzothiadiazol, 6-Äthoxy-1,2,3-benzothiadiazol, 6-Methoxy-1,2,3-benzothiadiazol, 5-Chlor-1,2,3-benzothiadiazol, 6-Brom-1,2,3-benzothiadiazol, 6-Chlor-1,2,3-benzothiadiazol	Dr. D.L. Gil, Universidad de Chile, Santiago
1-Naphthyl-4(5)-imidazol, (4-Phenyl)-phenyl-4(5)-imidazol	Dr. Wilkinson, Cornell University, Ithaka, N.Y.

Alle allgemein gebräuchlichen Laborchemikalien und Biochemikalien wurden bezogen durch die Firmen:

Merck AG, Darmstadt
Boehringer, Mannheim
Serva, Heidelberg

2.2. Untersuchungen am Menschen

Einige Experimente zur Pharmakokinetik von Vinylchlorid am Menschen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. med. A. Buchter (Institut für Arbeitsmedizin und Sozialmedizin der Universität Köln) durchgeführt. Die Methodik der Untersuchungen wurde von Buchter et al. (1978) beschrieben.

2.3. Tiermaterial

Die meisten Experimente wurden mit männlichen Wistar-Ratten zwischen 180 g und 250 g Körpergewicht durchgeführt. Für einen Teil der Versuche mit Vinylbromid wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten zwischen 180 g und 250 g Körpergewicht verwendet.

Einige Messungen des Metabolismus von Vinylchlorid wurden mit neugeborenen bzw. bis zu 8 Tage alten Wistar-Ratten beiderlei Geschlechtes vorgenommen.

Ferner wurden einzelne Versuche mit weiblichen weißen Mäusen ausgeführt.

Die Tiere stammten aus der Versuchstier-Zuchtanstalt Ivanovas, Kisslegg, Allgäu.

2.3.1. Vorbehandlung der Tiere

Zur Induktion arzneimittelabbauender Enzyme wurden Ratten nach Greim et al. (1970) vorbehandelt. Die Tiere erhielten eine einmalige Injektion von 80 mg/kg Körpergewicht Phenobarbital-Natrium intraperitoneal (Lösung: 80 mg/ml Leitungswasser). Anschließend wurde 5 Tage lang Phenobarbital im Trinkwasser in 0,1-prozentiger Lösung verabreicht. Ein Tag vor dem Versuch wurde die Behandlung abgebrochen.

Zur Hemmung des oxidativen Fremdstoffmetabolismus in vivo wurden verwandt:

a) 6-Chlor-1,2,3-benzothiadiazol bzw. 5-Chlor-1,2,3-benzothiadiazol: 200 mg in 0,5 ml Cremophor EL einrühren, dann 1,5 ml Leitungswasser zugeben und 150 mg/kg Körpergewicht 1 h bis 2 h vor Versuchsbeginn i.p. applizieren (siehe Bolt et al., 1976 a, und Bolt et al., 1977 a).

b) Dithiocarb: 100 mg in 2 ml Leitungswasser lösen und in einer Konzentration von 100 mg/kg bzw. 200 mg/kg Körpergewicht 10 min vor Versuchsbeginn i.p. applizieren.

c) Disulfiram: 100 mg in 2 ml Leitungswasser suspendieren und 1 h vor Versuchsbeginn i.p. injizieren.

Zur Depletierung des hepatischen Glutathionspiegels wurden 0,6 ml Maleinsäurediäthylester pro kg Körpergewicht 15 min vor Versuchsbeginn i.p. injiziert (Boyland und Chasseaud, 1970).

2.3.2. Exposition der Tiere

Die Tiere wurden in verschiedenen Exsikkatoren, die als Expositionskäfige dienten, den zu untersuchenden Gasen und Lösungsmitteldämpfen ausgesetzt (Abb. 3).

Im Prinzip wurde die von Bolt et al. (1976 a) beschriebene

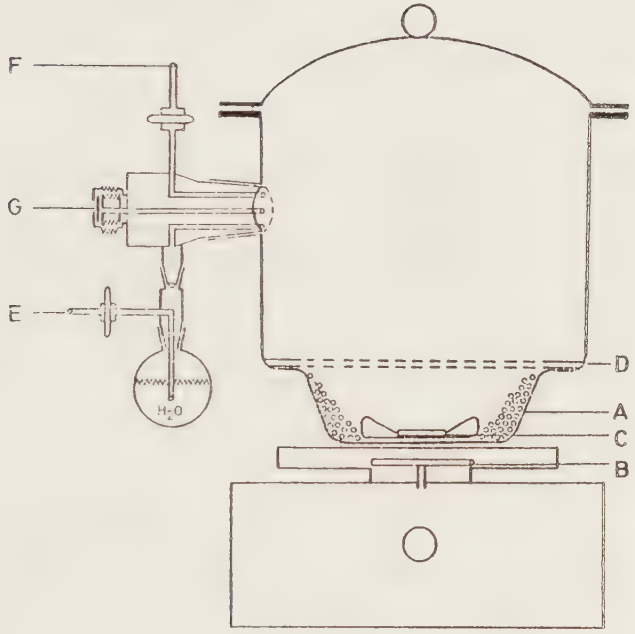


Abb. 3: Schema des gläsernen Expositionssystems
(A) Atemkalk, (B) Magnetrührer, (C) Rührmagnet,
(D) Porzellanplatte, (E) Sauerstoffeinlaß,
(F) Gaseinlaß, (G) mit Teflon beschichtetes Gummiseptum

Methode angewandt, die je nach den Versuchsbedingungen abgewandelt wurde. Die meisten Untersuchungen wurden in einem Exsikkator mit einem Gesamtvolumen von 10,3 l durchgeführt. Im allgemeinen wurden je 3 Ratten simultan exponiert. Für die Bestimmung der Pharmakokinetik von Tetrachlorkohlenstoff bei der Maus wurde ein kleinerer Exsikkator von 2,74 l Volumen benutzt. Die Expositionszeiten betrugen je nach der zu untersuchenden Substanz zwischen 20 min und 14 h.

Der Boden der Exsikkatoren wurde jeweils mit 150-175 g Atemkalk (A) bedeckt. Mit Hilfe eines Magnetrührers (B), der einen in einem kleinen Glaspropeller liegenden Rührmagneten (C) antrieb, wurde die Luft des Expositionssystems umgewälzt. Über dem Exsikkatorboden befand sich eine durchlöcherte Porzellanplatte (D), die als Boden für die Tiere diente. Ein mit Sauerstoff gefülltes Spirometer war mit dem Sauerstoffeinlaß (E) verbunden. Hinter dem Sauerstoffeinlaß war eine kleine, mit Wasser gefüllte Waschflasche angebracht. Das Spirometer, das eine mechanische Aufzeichnung des verbrauchten Sauerstoffs gestattete, war vom Typ 336 der Firma A. Dargatz, Hamburg. Durch den mit einem Schliffhahn versehenen Einlaß (F) wurden die zu untersuchenden, mit Luft verdünnten Gase in den Exsikkator eingebracht. Weiterhin wurden durch das mit Teflon beschichtete Gummiseptum (G) mit einer Spritze, die mit einer 20 cm langen, weit in das System hineinragenden Kanüle versehen war, abgemessene Mengen der zu untersuchenden Gase zugegeben bzw. entnommen. Zur Injektion flüssiger Kohlenwasserstoffe wurde eine Hamilton-Spritze benutzt. Die Gasentnahme geschah auf zweierlei Arten: Zur Untersuchung eines radioaktiv markierten Gases wurden mit einer 10 ml-Glasspritze, gefüllt mit 5 ml Toluol-Szintillator, 2 ml der radioaktiven Luft aus dem System entnommen. Nach 2-minütigem Schütteln wurde der Inhalt der Spritze zu weiteren 5 ml Toluol-Szintillator gegeben und die Radioaktivitätsmenge im Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt.

Zur Messung der Konzentrationsabnahme eines nicht markierten Gases im System wurden 10 ml Luftgemisch mit einer Einmal-Plastikspritze (Firma Henke-Sass, Wolf GmbH) dem Expositionssystem entnommen und sofort danach in eine 5 ml-Probeneinlaßschleife eines Gaschromatographen eingespritzt.

Für Versuche, die eine schnelle Umwälzung des Gases im System erforderten, wurde folgende Apparatur entwickelt (Abb. 4):

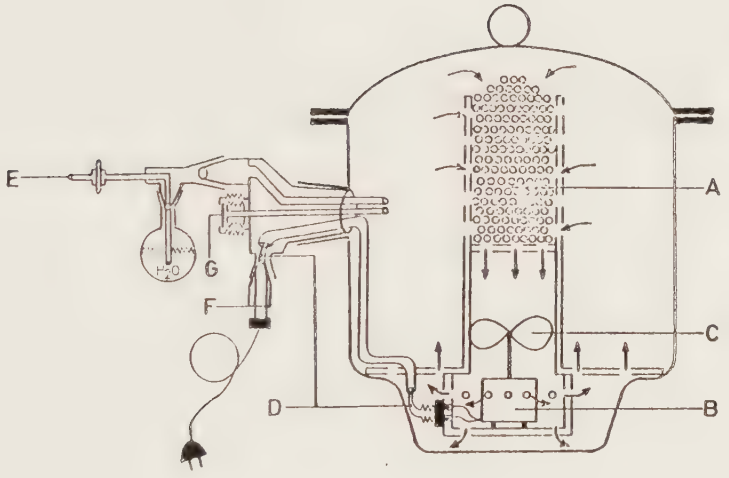


Abb. 4: Schema des PVC-Einsatzes im Expositionsexsikkator. (A) Atemkalk, (B) kollektorloser 220 V-Motor, (C) Propeller, (D) Stromzufuhr, (E) Sauerstoffeinlaß, (F) Netzanschluß, (G) mit Teflon beschichtetes Gummiseptum; Pfeile: Richtung der Luftzirkulation

Der PVC-Einsatz im Exsikkator bestand aus einem perforierten, würfelförmigen Motorgehäuse, das an der durchlöcherten Bodenplatte befestigt war, auf der sich während des Versuches die Tiere befanden, und aus einem zentralen, zylinderförmigen Aufsatz. Im Motorgehäuse war ein schnell laufender, kollektorloser 220-V-Wechselstrommotor (B), dessen Achse mit aufgesetztem Propeller (C) in die untere Hälfte des Zylinders reichte. Ein kollektorloser Motor wurde gewählt, um Funkenbildung auszuschließen. Die obere Zylinderhälfte, von der unteren durch einen durchlöcherten Boden

getrennt, war ebenfalls perforiert und diente zur Aufnahme des Atemkalks (A). Die Luft zirkulierte in der durch die Pfeile angegebenen Richtung.

Am Schliff des Exsikkators war ein gläsernes 3-Wege-System angesetzt für die Sauerstoffversorgung (E), die Zugabe bzw. Entnahme von Proben (G) und für die Stromversorgung des Motors (F). Das System unterschied sich von dem in Abb. 3 dargestellten durch den Anschluß (F). Hier waren zwei Platindrähte (D) eingeschmolzen, die nach außen mit einem Netzkabel verbunden waren.

Die Untersuchungen zur Ausatmung von Aceton wurden in Exsikkatoren von je 5,8 l Gesamtvolumen durchgeführt. In einem Exsikkator befanden sich zwei männliche Wistar-Ratten von je 250 g. Wegen der sehr langen Expositionszeiten (über 25 h) wurden jeweils 450 g Atemkalk und 10 ml Leitungswasser zugegeben. Bei diesen Versuchen wurde auf Umwälzung der Luft verzichtet. Die Expositionen wurden durch Injektion der berechneten Menge des gasförmigen bzw. flüssigen Stoffes in das System gestartet. Da bei Hunger Aceton ein normales Ausatmungsprodukt ist, wurden jeweils simultane Kontrollversuche bei gleicher Sauerstoffversorgung durchgeführt. Die Konzentrationen an Aceton bzw. an halogeniertem Kohlenwasserstoff wurden gaschromatographisch bestimmt. Als Sauerstoffvorratsbehälter dienten für diese Versuche 3 durch Silikonschläuche miteinander verbundene, mit Aluminium beschichtete "Plastigas"-Säcke der Firma Linde mit je 20 l Inhalt. Da der in Stahlflaschen gelieferte Sauerstoff teilweise signifikante Mengen an Aceton enthielt, wurde der Sauerstoff beim Einlassen in die Gassäcke durch Zwischenschaltung eines Oxysorb®-Filters von Aceton gereinigt.

Die Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Vinylchlorid bei neugeborenen Wistar-Ratten wurden in kleinen Exsikkatoren von 2,8 l Volumen durchgeführt. Die Exsikkatoren enthielten 10 ml Leitungswasser und 100 g Atemkalk. Sie standen während der Versuchszeit in einem Wasserbad von 37°C. Pro

Untersuchung wurde ein Wurf (10-12 Tiere) zwischen 2 h und maximal 4 h verschiedenen Vinylchloridkonzentrationen ausgesetzt.

2.4. Dosierung der halogenierten Kohlenwasserstoffe in das Expositionssystem

2.4.1. Berechnung der Flüssigkeitsmenge

Die Menge an flüssigem Kohlenwasserstoff, die nach dem Verdampfen eine bestimmte Gaskonzentration im System ergeben sollte, wurde folgendermaßen berechnet:

Nach dem Boyle-Mariotteschen Gesetz für ideale Gase gilt:

$$p \cdot V = R \cdot T$$

Der für R einzusetzende Zahlenwert errechnet sich für V in ml und für p in Torr zu:

$$R = 62{,}3669 \cdot 10^3 \text{ ml} \cdot \text{Torr} \cdot K^{-1} \cdot \text{Mol}^{-1}$$

V bei 0^oC und 760 Torr ist: $22{,}4152 \cdot 10^3$ ml (D'Ans-Lax, 1967).

Da der durchschnittliche Luftdruck in Tübingen ca. 740 Torr beträgt und die Temperatur im Expositionssystem 25^oC betrug, errechnet sich das Molvolumen eines idealen Gases zu $V' = 25{,}13 \cdot 10^3$ ml.
(Nur bei den Versuchen mit neugeborenen Ratten wurde bei 37^oC gearbeitet.)

Für eine flüssige Substanz gilt:

$$Mg/D = V'_{fl}$$

Mg = Molekulargewicht in g
D = Dichte in g/ml
V'_{fl} = Molvolumen der Flüssigkeit in ml

Nimmt man vereinfachend an, daß sich die untersuchten flüssigen Kohlenwasserstoffe nach dem Verdampfen wie ideale Gase verhalten, dann füllt V'_{fl} nach dem Verdampfen ein Volumen von V' aus. Das zur Herstellung einer bestimmten Gaskonzentration (in ppm ausgedrückt) im Luftraum des Expositionsgefäßes benötigte Flüssigkeitsvolumen errechnet sich demnach folgendermaßen:

$$V_{fl} = \frac{V'_{fl} \cdot V_L}{V'} \cdot \frac{x}{10^6}$$

x ist die gewünschte Gaskonzentration im ppm;
V_{fl} ist die hierzu benötigte Flüssigkeitsmenge in ml;
V_L ist das Gesamtvolumen im Expositionsgefäß.

Da die benötigten Mengen an flüssigen Kohlenwasserstoffen sich im Mikroliterbereich bewegten, wurden sie mit einer Hamilton-Spritze mit aufgesetzter 20 cm langer Kanüle den Vorratsgefäßen entnommen und durch das Septum in den Exsikkator injiziert.

2.4.2. Zugabe reiner Gase in das Expositionssystem

Die Zugabe reiner Gase in das Expositionssystem geschah unter Benutzung der in Abb. 5 dargestellten Apparatur.

Zwei Gasflaschen (A, A') waren kurz über ihrem Boden durch einen Gummischlauch miteinander verbunden. Auf einer der beiden Flaschen (A) befand sich ein Aufsatz (B) mit Schliff, der über einen Hahn und ein mit Teflon beschichtetes Septum verfügte. Nachdem durch Heben von Flasche (A') bei abgeschraubtem Septum die Flasche (A) vollständig mit Wasser gefüllt worden war, wurde das Septum wieder aufgeschraubt, der Hahn des Aufsatzes (B) über einen Silikonschlauch mit der Gasbombe verbunden und die gewünschte Menge Gas in die Flasche (A) eingelassen. Durch Niveauausgleich ließ sich das Gas mittels einer Spritze durch das

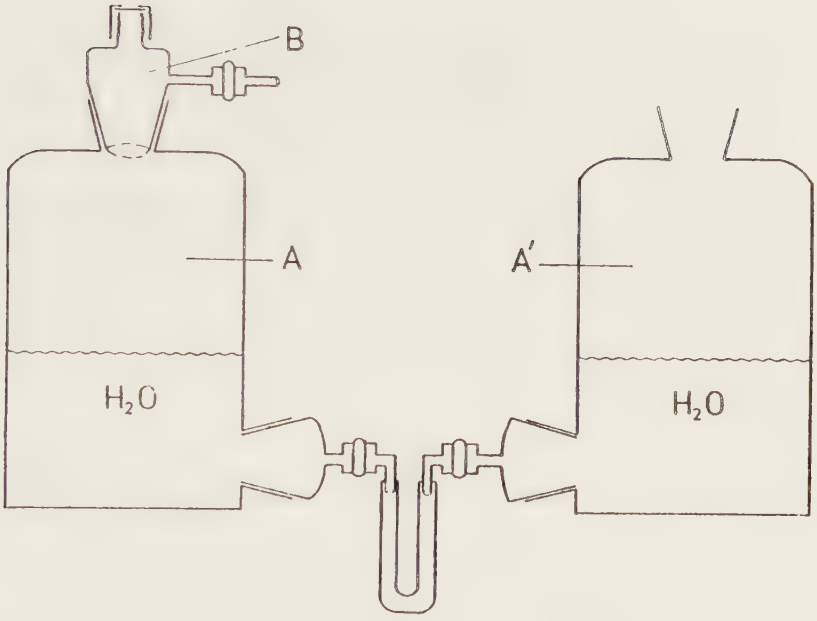


Abb. 5: Apparatur zur Aufbewahrung wasserunlöslicher Gase (A) Gasraum; (A') Luftraum; (B) Aufsatz mit Hahn und Septum

Septum unter Atmosphärendruck entnehmen. (Der Dampfdruck des Wassers wurde nicht berücksichtigt.) Die entnommene Gasmenge wurde sofort danach in das Expositionsgefäß eingespritzt.

2.4.3. Zugabe von Dampf-Luft-Gemischen in das Expositionssystem

Bei einigen flüssigen Kohlenwasserstoffen erwies es sich als günstig, sie dampfförmig in das System zu injizieren, wenn sehr niedere Konzentrationen vorgegeben werden sollten. Die Vorratsflasche mit dem flüssigen Kohlenwasserstoff wurde bei Raumtemperatur im Abzug geöffnet, und mit der Einmalspritze wurde knapp über der Flüssigkeitsoberfläche ein Dampf-Luft-Gemisch entnommen, welches anschließend sofort in das Expositionssystem injiziert wurde. Um die für eine bestimmte Anfangskonzentration benötigte Menge zu berechnen, wurden die in Abb. 6 gezeigten Dampfdruck-Temperatur-Diagramme erstellt (siehe D'Ans-Lax, 1967).

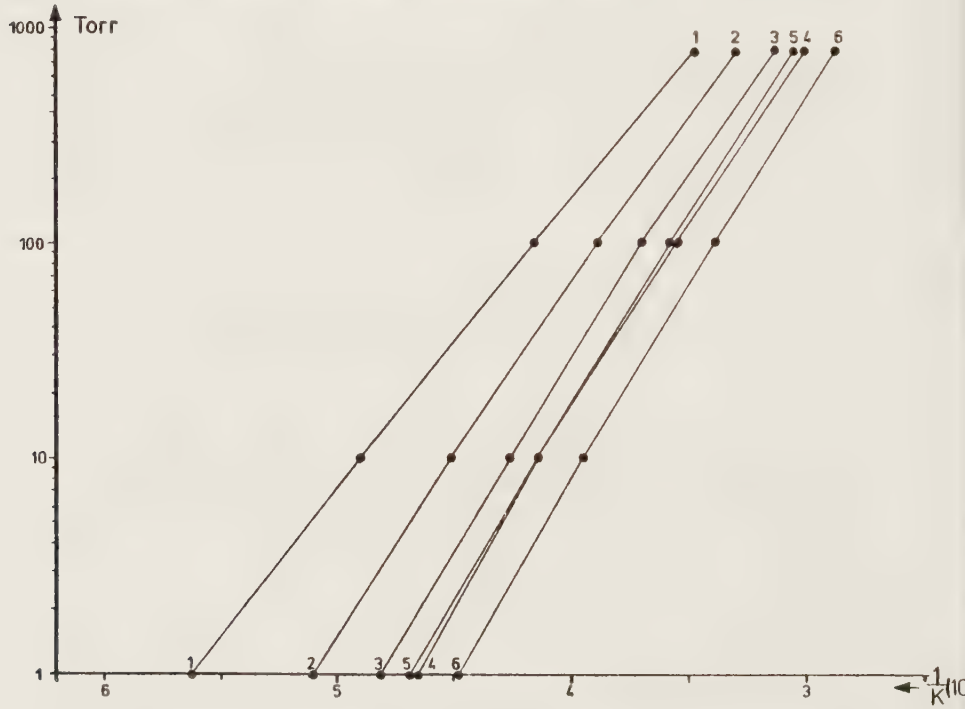


Abb. 6: Dampfdruck-Temperatur-Diagramme verschiedener halogenierter Äthylene sowie von Aceton und Tetrachlorkohlenstoff
(1) Vinylbromid; (2) Vinylidenchlorid; (3) trans-Dichloräthylen; (4) cis-Dichloräthylen; (5) Aceton; (6) Tetrachlorkohlenstoff

Der Partialdruck bei 25°C (p_{Kw}) wurde aus dem Diagramm abgelesen. Der durchschnittliche Luftdruck in Tübingen (p_{Tbg}) beträgt 740 Torr.

V_L ist der Gasraum des Expositionsgefäßes,

V_{Kw} ist das Gasvolumen, welches einer Million ppm des jeweiligen Kohlenwasserstoffgases bei dem entsprechenden Partialdruck (p_{Kw}) entspricht.

Nach dem Boyle-Mariotteschen Gesetz gilt:

$$V_{Kw} = \frac{p_{Tbg}}{p_{Kw}} \cdot V_L$$

Daraus folgt:

$$V_{Gasgemisch} = \frac{p_{Tbg}}{p_{Kw}} \cdot \frac{V_L}{10^6} \cdot x$$

$V_{Gasgemisch}$ ist das mit der Spritze über der Flüssigkeitsoberfläche zu entnehmende Gasvolumen;

x ist die gesuchte Anfangskonzentration in ppm.

2.5. Gaschromatographische Analyse

Die mittels einer 10 ml-Einmalspritze dem Expositionssystem entnommenen Gasproben wurden über ein Gasprobenventil mit einer Dosierschleife von 5 ml in einen Gaschromatographen vom Typ Varian 1440 eingegeben. Die Schleife war mit einer rostfreien 3 m langen Stahlsäule von 1/8 Zoll Durchmesser verbunden, diemit Porapak Q (50-80 mesh) beladen war. Die Säulentemperaturen wurden je nach dem zu analysierenden Gas variiert. Die Detektortemperatur des Flammenionisationsdetektors betrug 260°C. Die Gasdurchflußraten waren: Stickstoff 60 ml/min; Wasserstoff 30 ml/min; synthetische Luft 300 ml/min.

2.6. Massenspektrometrie

Zur GC/MS-Messung wurde ein Varian MAT 112 Massenspektrometer benutzt, der an einen Varian Gaschromatographen vom Typ 1440 angeschlossen war. Das Gerät verfügte über einen FID/MS-Separator, der sowohl die Flammenionisationsmessung als auch die gleichzeitige Massenspektrometrie erlaubte. Der Separator teilte den aus der Säule kommenden Gasstrom im Verhältnis 1/1 auf. Helium (80 ml/min) wurde als Trägergas benutzt. Wasserstoff (80 ml/min) und synthetische Luft (300 ml/min) wurden für den Flammenionisationsdetektor benötigt. Die 3 m lange Stahlsäule, beschickt mit Porapak Q (50-80 mesh), wurde auf einer Temperatur von 180°C gehalten. Injiziert wurden jeweils 5 ml des Gas-Luft-Gemisches aus dem Expositionssystem. Die Temperaturen für das Massenspektrometer waren: Separator 180°C, Interface 185°C, Ionenquelle 180°C. Die Ionisationsenergie betrug 80 eV.

2.7. Radioaktivitätsmessung

Die Radioaktivität wurde in einem Berthold BF 5000 Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

Szintillatoren:

1. Toluolszintillator (löst alle lipophilen Substanzen); er enthielt 4 g PPO + 0,1 g POPO in 1 l Toluol.
2. Bray-Szintillator (ist mit Wasser mischbar, löst sowohl polare wie auch lipophile Substanzen); er wurde nach Bray (1960) hergestellt.

2.7.1. Bestimmung von radioaktiven Metaboliten im Urin

Die im Urin enthaltene Menge an radioaktiven Metaboliten von markiertem Vinylbromid, Trichloräthylen und Tetrachlor-

kohlenstoff wurde nach der von Bolt et al. (1977 a) beschriebenen Methode bestimmt. Hierzu wurden 3 Ratten gegenüber den Dämpfen dieser 3 Kohlenwasserstoffe exponiert, wie unter 2.3.2. beschrieben. Nach Expositionsende wurden die Tiere in 3 Stoffwechselkäfige überbracht. Die bis zu diesem Zeitpunkt aufgenommene Radioaktivitätsmenge wurde als 100 % bezeichnet.

Um die Sammlung von Urinproben zu erleichtern, wurden den Tieren 5 stündliche Dosen von je 5 ml Leitungswasser mittels einer Schlundsonde verabreicht. Vor der Messung wurde der Urin mit destilliertem Wasser auf 20 ml verdünnt. Hiervon wurden 0,5 ml zu 10 ml Bray-Szintillator gegeben und die Radioaktivität bestimmt.

2.7.2. Bestimmung von irreversibel an Protein gebundenen radioaktiven Metaboliten

Es wurden die irreversibel an Protein gebundenen radioaktiven Metaboliten von [1,2-^{14}C]-Vinylchlorid, [1,2-^{14}C]-Trichloräthylen und ^{14}C-Tetrachlorkohlenstoff nach der Methode von Bolt et al. (1976 b) bestimmt. Hierzu wurden - wie unter 2.3.2. beschrieben - jeweils 3 bzw. 4 Wistar-Ratten im 10,3 l-Exsikkator gegenüber radioaktivem Vinylchloridgas bzw. gegenüber den Dämpfen der beiden anderen radioaktiven Chlorkohlenwasserstoffe exponiert. Sofort nach Expositionsende wurden die Tiere dekapitiert. Nach dem Ausbluten wurden von verschiedenen Geweben Proben zwischen 0,5 und 2 g entnommen und mittels eines Ultra-Turrax-Gewebshomogenisators mit dem vierfachen Volumen destillierten Wassers homogenisiert. Nach Eingabe von jeweils 0,5 ml des Homogenisates in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 0,9 ml Äthanol einpipettiert, die Gefäße fest verschlossen, 2 min lang geschüttelt und über Nacht ins Gefrierfach gestellt. Das gefällte Protein wurde in der Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert, der Überstand verworfen und der

Niederschlag mit 70-prozentigem Äthanol versetzt. Nach gründlichem Waschen wurde wieder abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das gefällte Protein wurde nochmals mit 0,5 ml 70-prozentigem Alkohol versetzt, aufgerührt und 30 min lang auf 96°C erhitzt. Schließlich wurde abzentrifugiert und noch ein drittes Mal mit 0,5 ml 70-prozentigem Äthanol gewaschen. Nach Zentrifugation wurden zu jeder Proteinprobe 0,3 ml dest. Wasser und 0,3 ml 1 M Hyaminhydroxidlösung einpipettiert. Dann wurde 20 min lang geschüttelt; anschließend wurden die Proben bis zum Auflösen bei 40°C aufbewahrt. Zur Vermeidung von Chemolumineszenz wurden nun in jedes Gefäß 0,3 ml einer Benzoylperoxidlösung zugegeben (Benzoylperoxidlösung: Überstand von 12,5 g käuflichem Benzoylperoxid und 12,5 g Kalziumchlorid in 100 ml Toluol).

Die Proben wurden über Nacht bei 37°C aufbewahrt. Dann wurde der Inhalt samt Eppendorf-Reaktionsgefäß in je 10 ml Bray-Szintillator gegeben. Nach Kontrolle auf Abwesenheit von Chemolumineszenz, die als "random coincidences" gemessen wurde (siehe Kappus und Remmer, 1975), wurde die Radioaktivität gemessen.

2.8. Untersuchungen in vitro

2.8.1.1. Präparation der Lebermikrosomen

Die Lebermikrosomen wurden in der üblichen Weise nach Remmer et al. (1967) präpariert. Nach Dekapitation und Ausbluten der Tiere wurden die Lebern mit der 6,5-fachen Menge eines eiskalten Homogenisationsmediums (Lösung I) versetzt und im Potter-Homogenisator unter Eiskühlung homogenisiert. Das Homogenat wurde 10 min bei 7000 g zentrifugiert. Der enthaltene Überstand wurde 45 min bei 105 000 g in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Die abzentrifugier-

ten Mikrosomen wurden in ca. 12 ml KCl-Tris-Puffer (Lösung II) resuspendiert und erneut 45 min bei 105 000 g abzentrifugiert. Anschließend wurden sie in so viel KCl-Tris-Puffer suspendiert, daß 1 ml Suspension 5 mg mikrosomales Protein enthielt.

Lösung I: Saccharose: 0,25 M;
Äthylendinitrilotetraessigsäure-Dinatriumsalz (= Titriplex® III): 1 mM

Lösung II: 4 Teile KCl 0,15 M + 1 Teil Tris-HCl 0,25 M; pH 7,5

Ohne meßbaren Aktivitätsverlust ließen sich Mikrosomen bei -80°C 4 Wochen lang aufbewahren. Hierzu wurden sie nach der 2. Zentrifugation bei 105 000 g in so viel "SVT-Lösung" nach Leybold und Staudinger (1959) suspendiert, daß 1 ml Suspension Mikrosomen von 0,5 g Lebernaßgewicht enthielt, und eingefroren. Vor Versuchsbeginn wurden die Mikrosomen aufgetaut, 45 min bei 105 000 g abzentrifugiert und anschließend in so viel KCl-Tris-Puffer aufgenommen, daß eine Konzentration von 5 mg Protein pro ml Pufferlösung erreicht wurde.

"SVT-Lösung": aqua bidestillata;
Saccharose 0,25 M;
Titriplex® III 5,5 mM;
Tris-HCl 0,02 M;
mit 1 N HCl auf pH 7,4 eingestellt

2.8.1.2. Proteinbestimmung

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde nach Lowry et al. (1951) durchgeführt.

2.8.2. Inkubationsapparatur

Für die verschiedenen in-vitro-Versuche wurde die von Kappus et al. (1976) beschriebene Apparatur verwendet, die es erlaubte, definierte Partialdrucke der untersuchten Gase über den Inkubationsansätzen herzustellen.

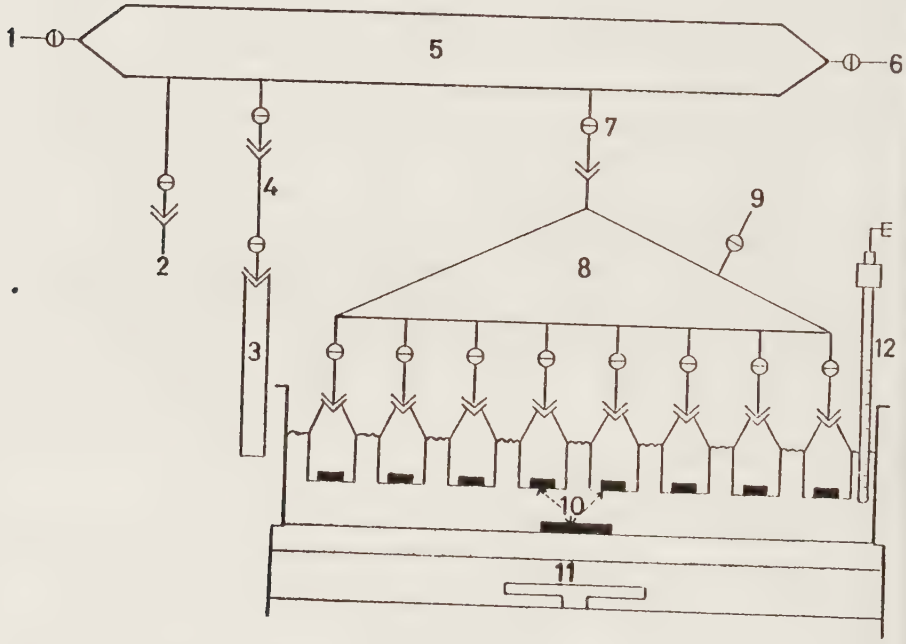


Abb. 7: Schema der gasdichten gläsernen in-vitro-Versuchsapparatur, in der die Gase für die Inkubationsansätze dosiert wurden.
(1) Hochvakuumpumpe; (2) Quecksilbermanometer; (3) Spezialampulle mit radioaktiv markiertem Gas; (4) Verbindungsstück; (5) Gasspeicher; (6) Lufteinlaß; (7) Starthahn; (8) Verbindungsraum zu den Inkubationsgefäßen; (9) Wasserstrahlpumpe; (10) Rührmagnete für die Inkubationsansätze und das Wasserbad; (11) Magnetrührer; (12) Kontaktthermometer.

Die Glasapparatur verfügte über vakuumdichte Höhne. Alle Schliffe waren mit Silikonfett behandelt.

Nach Evakuierung (über 1) des Gasspeichers (5) und des Verbindungsstücks (4) bei geschlossenem Hahn (7) wurde ein Aliquot des radioaktiven Gases durch das Verbindungsstück (4) in den Gasspeicher (5) eingelassen.

Der Gasdruck wurde über ein Quecksilbermanometer (2) gemessen. Dann wurde durch den Hahn (6) Luft in den Speicherraum (5) eingelassen. Anschließend wurde Teil (8) der Apparatur zusammen mit den 8 Inkubationsgefäßen durch den Hahn (9) mit der Wasserstrahlpumpe evakuiert. Die Inkubationsgefäße hatten ein Volumen von je 4 ml und enthielten die Inkubationsansätze und je einen Rührmagneten (10). Während der Evakuierung wurden sie im Eisbad gekühlt.

Nachdem sich das Wasserstrahlvakuum eingestellt hatte, wurde der Hahn (9) geschlossen und das Gas durch Öffnen von Hahn (7) eingelassen. Nach Druckausgleich wurde das Manometer abgelesen, Hahn (7) geschlossen und Hahn (9) kurz geöffnet, um Luft einzulassen, wodurch sich im unteren Teil der Apparatur wieder Normaldruck einstellte. Gleichzeitig wurde das Eisbad durch ein Wasserbad von 37°C ersetzt und der Magnetrührer (11) eingeschaltet. Da sich im Wasserbad ebenfalls ein Magnet (10) befand, wurden das Wasserbad und die Inkubationsansätze gleichzeitg gerührt. Die Temperatur des Wasserbades wurde durch ein Kontaktthermometer (12) kontrolliert, welches mit der Heizplatte des Magnetrührers (11) verbunden war.

Der jeweilige Partialdruck (p_x) der untersuchten Gase über den Inkubaten wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$(1) \quad p_x = \frac{p_G \ (1-p_I/p_N)}{F}$$

p_x ist der gesuchte Partialdruck des Gases im Inkubationssystem;

p_G ist der Partialdruck des Gases im Gasspeicherraum (5) vor Einlassen derLuft;

P_I ist der Gasdruck im Gesamtsystem nach Öffnen von Hahn (7);
P_N ist der am Barometer abgelesene Luftdruck;
F ist das Verhältnis des Volumens des Teiles (8) der Apparatur einschließlich der Inkubationsgefäße zu dem Volumen des Gasspeicherraumes (5).

Das Inkubationssystem erlaubte die gleichzeitige Exposition von 8 verschiedenen Inkubationsansätzen gegenüber einem bestimmten Partialdruck. Da sich zwischen Teil (8) der Apparatur und den Inkubationsgefäßen jeweils ein Gashahn befand, war es möglich, die Inkubationsgefäße zu bestimmten Zeitpunkten einzeln von der Apparatur abzunehmen.

2.8.3. Inkubationen mit Lebermikrosomen

2.8.3.1. Allgemeine Inkubationsbedingungen

Die Inkubationsbedingungen wurden entsprechend der Arbeit von Kappus (1973) gewählt. Die Inkubationsgefäße der in-vitro-Apparatur enthielten pro Ansatz (1 ml):

Tris-HCl 0,25 M, pH 7,5;
$MgCl_2$ 5 mM;
D-L-Natriumisocitrat 8 mM;
$NADP^+$ 1 mM
Isocitratdehydrogenase aus Schweineherz von Böhringer:
5 µl/ml Ansatz.

Die mikrosomale Proteinkonzentration betrug 1-1,5 mg/ml Ansatz.

$NADP^+$ wurde als letztes Substrat in den eisgekühlten Ansatz gegeben. Dann wurden die 8 Reaktionsgefäße an die in-vitro-Apparatur angeschlossen und die Reaktion nach Einstellen des gewünschten Partialdruckes (wie in 2.8.2. beschrieben) durch Erwärmen auf 37°C gestartet. Nach 5-minütiger Vorin-

kubation (Leerwert) wurde mit der Messung begonnen. Die Versuchsdauer variierte je nach den Versuchsbedingungen und betrug maximal 60 min. Die zugegebene Isocitratdehydrogenase und das Isocitrat dienten als NADPH-regenerierendes System (Remmer et al., 1967).

Die mischfunktionelle Oxidase ist ohne NADPH inaktiv. Daher wurden zum Vergleich auch Bindungsstudien mit radioaktiv markierten halogenierten Kohlenwasserstoffen ohne $NADP^+$-Zugabe durchgeführt.

2.8.3.2. Aufnahme radioaktiver Gase in Lebermikrosomen

Es wurde so verfahren wie dies von Kappus et al. (1976) für Vinylchlorid beschrieben wurde. Nach Inkubationsende wurden 100 µl aus dem 1 ml-Reaktionsansatz eines Inkubates der in-vitro-Apparatur entnommen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß einpipettiert, welches 200 µl einer 1 M Hyaminhydroxidlösung enthielt. Dann wurden die Proben bis zum Auflösen bei 40°C aufbewahrt. Die weitere Aufarbeitung geschah wie unter 2.7.2. beschrieben. Nach Messung der Radioaktivität ließ sich, da die spezifische Aktivität der einzelnen Gase bekannt war, die aufgenommene Radioaktivität in nMol Substanz pro mg mikrosomales Protein berechnen.

2.8.3.3. Alkylierung von mikrosomalem Protein durch radioaktive Metaboliten

Es wurden Inkubationsansätze wie unter 2.8.3.1. beschrieben über verschieden lange Zeiträume gegenüber verschiedenen Konzentrationen der radioaktiv markierten Gase exponiert.

Nach Abnahme eines Reaktionsgefäßes von der in-vitro-Apparatur (2.8.2.) wurden 500 µl des Inkubates entnommen und in ein eisgekühltes Eppendorf-Reaktionsgefäß einpipettiert,

welches 1 ml Äthanol enthielt. Das mikrosomale Protein wurde abzentrifugiert und noch 3 mal mit 70-prozentigem Äthanol gewaschen, hiervon 1 mal bei 96°C. Die genaue Aufarbeitung ist unter 2.7.2. beschrieben. Durch Zählung der Radioaktivität ließ sich die pro mg mikrosomales Protein gebundene Menge von Metaboliten des halogenierten Kohlenwasserstoffes berechnen, da die spezifische Aktivität des Substrates bekannt war.

2.8.3.4. Alkylierung von zugegebenem löslichem Protein durch radioaktive Metaboliten von [1,2-^{14}C]-Vinylbromid

Zum Zwecke von Bindungsstudien wurden Versuche mit zugesetztem löslichem Protein (5 mg/ml Inkubationsansatz) durchgeführt. Die einzelnen Proteine werden bei der Besprechung der Ergebnisse genannt. Die Inkubate wurden gegen Konzentrationen des radioaktiven Gases exponiert, bei denen das metabolisierende Enzymsystem mit maximaler Geschwindigkeit arbeitete. Nach 60 min wurden Reaktionsgefäße von der Apparatur (2.8.2.) abgenommen und ihr Inhalt sofort in eisgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben. Nach 30-minütiger Zentrifugation mit 15 000 Upm (28 000 g) in einer Sorvall-Zentrifuge bei 4°C wurden jeweils 0,5 ml des Überstandes entnommen und mit 1 ml absoluten Äthanols in Eppendorf-Reaktionsgefäßen gefällt. Nach Zentrifugation wurde der Niederschlag weiterbehandelt, wie unter 2.7.2. beschrieben. Da die spezifische Aktivität des verwendeten Gases bekannt war, ließ sich nach Messen der Radioaktivität die pro mg löslichem protein gebundene Menge an Metaboliten bestimmen.

2.8.3.5. Inkubationen mit zugesetzten Hemmstoffen der mischfunktionellen Oxidase

In einen gekühlten Inkubationsansatz (1 ml, siehe 2.8.3.1.) wurden 10 µl in Äthanol gelösten Hemmstoffes einpipettiert, so daß sich eine Endkonzentration des Hemmstoffes von 10^{-4} M ergab. Ebenso wurden in einen Kontrollansatz 10 µl Äthanol zugegeben. Nach Exposition der Inkubate in der in-vitro-Apparatur (2.8.2.) gegenüber den radioaktiv markierten Gasen wurde die Alkylierung mikrosomalen Proteins, wie in 2.8.3.3. beschrieben, gemessen.

2.9. Pharmakokinetische Analyse

Die Kinetik der Aufnahme der zu untersuchenden gasförmigen und dampfförmigen Stoffe bis zur Einstellung des Gleichgewichtes zwischen Atmosphäre und Organismus und die kinetischen Größen der metabolischen Eliminierung ließen sich bestimmen durch die Messung der Abnahme der Gaskonzentration im Luftraum des Systems (siehe 2.3.2.) bei Exposition der Tiere. Die Gaskonzentrationen werden im allgemeinen in ppm ("parts per million") angegeben, da in der toxikologischen und technischen Literatur diese Maßeinheit zur Angabe von Gaskonzentrationen allgemein gebräuchlich ist.

Geht man von einer genügend hohen Anfangskonzentration der Substanz im System aus und trägt den in der Gasphase gemessenen Konzentrationsverlauf gegen die Zeit auf, so wird eine typische Meßkurve erhalten, die am Beispiel von Vinylbromid erklärt werden soll (Abb. 8).

In Abb. 8 sind die bei Exposition von Ratten gegenüber Vinylbromid erhaltenen Meßwerte einmal in halblogarithmischem Maßstab (a) und einmal in linearem Maßstab (b) aufgetragen. Die initiale Phase A zeigt die schnellste Abnahme der Gaskonzentration im System. In dieser Phase wird das Gas von den Tieren aus dem Luftraum bis zur Gleichgewichtseinstel-

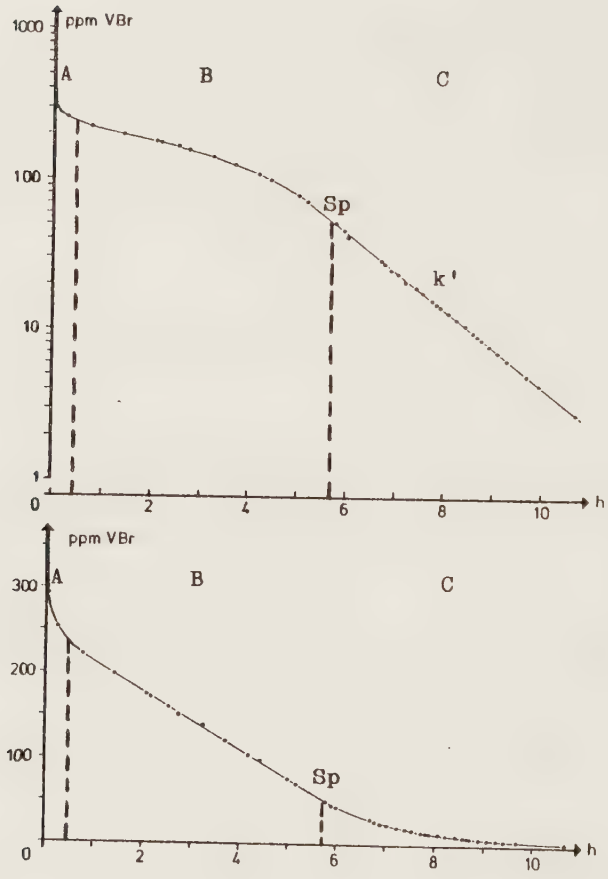


Abb. 8: Abnahme der Vinylbromidkonzentration (VBr) im Gasraum (9800 ml) bei Exposition von 3 Wistar-Ratten à 180 g
(A) Aufnahmephase; (B) Phase maximaler Metabolisierungsgeschwindigkeit (Kinetik nullter Ordnung); (C) Kurvenverlauf nach Kinetik 1. Ordnung; (Sp) Sättigungspunkt; (k') Steigung in Phase C

lung mit dem Organismus aufgenommen.

Der weitere Konzentrationsabfall wird durch metabolische Prozesse hervorgerufen. Bereits im Falle von Vinylchlorid (Bolt et al., 1977 a) wurde gezeigt, daß die Metabolisierung nur unterhalb eines definierten Konzentrationsbereiches, in dem das metabolisierende System gesättigt ist, exponentiell (nach einer Kinetik 1. Ordnung) erfolgt. Im Sättigungsbereich selbst erfolgt die metabolische Eliminierung nach einer Kinetik nullter Ordnung. In Abb. 5 entspricht der Abschnitt B der Elimination nullter Ordnung; diese geht in Abschnitt C in eine Elimination 1. Ordnung über. Die Analyse durch ein "lineares pharmakokinetisches System" (Hefner et al., 1975) beschränkt sich auf den unterhalb des Sättigungspunktes (Sp) liegenden Konzentrationsbereich, in dem die Elimination nach einer Kinetik 1. Ordnung erfolgt. Der Übergang der Kinetik nullter Ordnung zu der Kinetik erster Ordnung geschieht in einem sehr engen Konzentrationsbereich, der deshalb als "Sättigungspunkt" (Sp) bezeichnet wird.

2.9.1. Gasaufnahme in den Organismus bis zum Gleichgewicht mit der umgebenden Atmosphäre (Gleichgewichtseinstellung)

Der Prozeß der initialen Einstellung des Gleichgewichts des gasförmigen Fremdstoffes in der umgebenden Atmosphäre und der Konzentration im Organismus läßt sich isoliert von den metabolischen Prozessen durch 2 verschiedene Methoden darstellen:

a) bei Blockierung des Metabolismus durch einen geeigneten Inhibitor durch direkte Messung (Abb. 9)

b) bei Stoffen, die langsam metabolisiert werden, durch Extrapolation des auf die Phase A (Abb. 8) folgenden Abschnitts der gemessenen Konzentrationskurve auf t = 0

und Ermittlung der Differenz zu den in der Initialphase A tatsächlich gemessenen Werten.

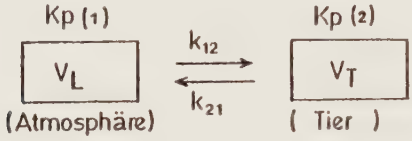


Abb. 9: Kinetisches Modell der Gasaufnahme in den Organismus bei durch einen Inhibitor (z.B. Dithiocarb) blockiertem Metabolismus

Zur Analyse des Prozesses der initialen Aufnahme des Fremdstoffes sind folgende theoretische Überlegungen anzustellen:

Bei Aufnahme eines Gases aus der Atmosphäre in das Gewebe (Partialprozeß 12) ist die Änderung der Teilchenzahl im Gasraum ($d\ N_L$) proportional einem Grenzflächenfaktor ($\emptyset$) und der Konzentration (C_L) des Gases im Luftraum.

Damit ergibt sich:

(1) $$d\ N_L = -a \cdot \emptyset \cdot C_L \cdot d\ t$$

Hierbei ist a der Proportionalitätsfaktor.

Für die Gaskonzentration gilt:

$$C_L = \frac{N_L}{V_L}$$

V_L ist das Volumen des Gasraums.

Daraus folgt:

(2) $$\frac{d\ C_{L12}}{d\ t} = \frac{1}{V_L} \cdot \frac{d\ N_L}{d\ t}$$

Gleichung (1), eingesetzt in Gleichung (2), ergibt für den Partialprozeß 12 (Abb. 9):

$$(3) \qquad \frac{d\,C_{L12}}{d\,t} = -a \cdot \frac{\emptyset}{V_L} \cdot C_L$$

$$\text{bzw.} \qquad \frac{d\,C_{L12}}{d\,t} = -k_{12} \cdot C_L$$

Dabei ist

$$(4) \qquad k_{12} = a \cdot \emptyset \,/\, V_L$$

Für die Rückdiffusion aus dem Gewebe (Partialprozeß 21; Abb. 9) ergibt sich aufgrund analoger Überlegungen:

$$(5) \qquad \frac{d\,C_{T21}}{d\,t} = -b \cdot \frac{\emptyset}{V_T} \cdot C_T$$

$$\text{bzw.} \qquad \frac{d\,C_{T21}}{d\,t} = -k_{21} \cdot C_T$$

Dabei ist

$$(6) \qquad k_{21} = b \cdot \emptyset \,/\, V_T$$

Hierbei sind C_T die Konzentration des gasförmigen Fremdstoffes im tierischen Gewebe, V_T das Volumen der Tiere und b der Proportionalitätsfaktor.

Für die Gesamtmenge des Gases gilt:

$$(7) \qquad C_L \cdot V_L + C_T \cdot V_T = C_{L(O)} \cdot V_L$$

$C_{L(O)}$ ist die Anfangskonzentration des Gases im Gasraum.

Für die gesamte Konzentrationsänderung im tierischen Gewebe (Kompartiment 2 der Abb. 9) gilt:

$$(8) \qquad \frac{d\,C_T}{d\,t} = \frac{d\,C_{T21}}{d\,t} + \frac{d\,C_{T12}}{d\,t}$$

Aus (7) ergibt sich für den Partialprozeß 12 folgende Differentialgleichung:

$$(9) \qquad \frac{d\,C_{T12}}{d\,t} = \frac{-V_L}{V_T} \cdot \frac{d\,C_{L12}}{d\,t}$$

Durch Einsetzen von (3) in (9) ergibt sich:

$$\frac{d\,C_{T12}}{d\,t} = \frac{-V_L}{V_T} \cdot (-k_{12} \cdot C_L)$$

oder

$$(10) \qquad \frac{d\,C_{T12}}{d\,t} = \frac{V_L}{V_T} \cdot k_{12} \cdot C_L$$

Aus (7) folgt:

$$C_L = C_{L(0)} - C_T \cdot \frac{V_T}{V_L}$$

In (10) eingesetzt:

$$(11) \qquad \frac{d\,C_{T12}}{d\,t} = k_{12}\ \frac{V_L}{V_T}\ C_{L(0)} - k_{12} \cdot C_T$$

Gleichung (5) und Gleichung (11), in Gleichung (8) eingesetzt, ergibt:

$$\frac{d\,C_T}{d\,t} = -k_{21} \cdot C_T + k_{12}\,\frac{V_L}{V_T}\,C_{L(O)} - k_{12} \cdot C_T$$

$$\frac{d\,C_T}{d\,t} = -C_T\,(k_{12} + k_{21}) + k_{12}\,\frac{V_L}{V_T}\,C_{L(O)}$$

$$\frac{d\,C_T}{d\,t} + (k_{12} + k_{21})\,C_T - k_{12}\,\frac{V_L}{V_T} \cdot C_{L(O)} = 0 \qquad (12)$$

Die Lösung dieser Differentialgleichung lautet:

$$C_{T(t)} = \frac{k_{12} \cdot V_L/V_T}{k_{12} + k_{21}} \cdot C_{L(O)}\left[1 - e^{-(k_{12} + k_{21})t}\right] \qquad (13)$$

Für $t \to \infty$ wird:

$$C_{T(\infty)} = \frac{k_{12} \cdot V_L/V_T}{k_{12} + k_{21}} \cdot C_{L(O)} \qquad (14)$$

Wird

$$k_{12} + k_{21} = k \qquad (15)$$

gesetzt, dann läßt sich Gleichung (13) auch folgendermaßen formulieren:

$$C_{T(t)} = C_{T(\infty)}\,\left[1 - e^{-kt}\right] \qquad (13\ a)$$

2.9.1.1. Bestimmung der kinetischen Parameter

In dem unter 2.3.2. beschriebenen Expositionssystem wird $C_{L(t)}$ gemessen. Hieraus läßt sich nach Gleichung (7) $C_{T(t)}$ berechnen:

$$C_{T(t)} = (C_{L(0)} - C_{L(t)}) \cdot V_L/V_T$$

Bekannt sind V_T (für die Tiere wurde ein spezifisches Gewicht von 1 angenommen), V_L (das Volumen des Gasraums) und $C_{L(0)}$ (die Anfangskonzentration des Gases im Gasraum). Durch Auftragen von $C_{T(t)}$ gegen t wird eine Kurve der allgemeinen Form

$$C_{T(t)} = C_{T(\infty)} [1 - e^{-kt}]$$

erhalten, wie sie nach Gleichung (13 a) abgeleitet wurde.

Mit Hilfe eines programmierbaren Rechners (Texas Instruments TI 59 mit angeschlossenem Drucker) war es möglich, durch Anpassung der gemessenen Werte an die theoretische Kurve (13 a) den jeweiligen Wert der Geschwindigkeitskonstante k zu ermitteln. Da im Gleichgewicht ($t \to \infty$) gilt:

$$\frac{d\,N_L}{d\,t} = \frac{d\,N_T}{d\,t} ,$$

wird

$$k_{12} \cdot \frac{V_L}{\emptyset} \cdot C_L = k_{21} \cdot \frac{V_T}{\emptyset} \cdot C_T$$

Die "Verteilungskonstante" K_{G1} des Konzentrationsgleichgewichtes zwischen Gasraum und Organismus wird dann:

$$(16) \quad \frac{[\text{Tier}_{\,t \to \infty}]}{[\text{Gasraum}_{\,t \to \infty}]} = K_{G1} = \frac{k_{12} \cdot V_L}{k_{21} \cdot V_T} = \frac{a}{b}$$

K_{G1} wird direkt aus den erhaltenen Meßdaten bestimmt. Mit Hilfe von (15) und (16) lassen sich die Geschwindigkeitskonstanten k_{12} und k_{21} errechnen:

$$k_{12} = K_{G1} \cdot k_{21} \cdot V_T/V_L; \quad k_{12} = k - k_{21}$$

$$k_{21} \cdot (1 + K_{G1} \cdot V_T/V_L) = k$$

$$(17) \quad k_{21} = \frac{k}{1 + K_{G1} \cdot V_T/V_L}$$

Im in den meisten Versuchen (mit Ratten) verwendeten Expositionssystem war V_L rund 16 mal größer als V_T. Mit der Aufnahme eines untersuchten Stoffes in den Körper der Tiere nahm die im Luftraum gemessene Gaskonzentration ab. Die Geschwindigkeit der Konzentrationsabnahme hängt nicht nur von den Stoffparametern, sondern auch von dem Volumen des Gasraumes ab. So sind k_{12} und k_{21} keine allgemeingültigen Konstanten, da sie sich auf Konzentrationsänderungen beziehen. Aus diesem Grunde wurden in Gleichung (1) und Gleichung (6) die Konstanten $a \cdot \emptyset$ und $b \cdot \emptyset$ eingeführt, die unabhängig von der Größe des Gasraumes bzw. dem Tiervolumen sind. Der Oberflächenfaktor $\emptyset$ ist immer dann gleich groß, wenn zu jeder Untersuchung gleichgroße Tiere derselben Spezies herangezogen werden, muß aber berücksichtigt werden, sollen die Meßergebnisse einer Tierart mit denen einer anderen mit wesentlich differierender Oberfläche verglichen werden. Deshalb können $a \cdot \emptyset = k_{12} \cdot V_L$ (4) und $b \cdot \emptyset = k_{21} \cdot V_T$ (6) innerhalb einer Tierspezies wie "gastypische" Konstanten behandelt werden.

2.9.2. Metabolismus

Aus der Analyse der Abschnitte B und C einer Meßkurve, wie sie in Abb. 8 dargestellt ist, lassen sich die kinetischen Daten der metabolischen Elimination berechnen. Die Abschnitte geben, nach der Zeit differenziert, die Geschwindigkeiten der metabolischen Elimination oberhalb und unterhalb des Sättigungspunktes (Sp in Abb. 8) an. Mit Hilfe des elektronischen Rechners wurde für den Teil B der Kurve eine Ausgleichsgerade berechnet.

Die Steigung der Geraden ist ein Maß für die maximale Geschwindigkeit (v'_{max}), mit der die Substanz aus dem Luftraum des Expositionssystems (V_L) eliminiert wird.

Diese läßt sich durch Umrechnung der ppm-Werte (C_L) in µmol/ml (Division der C_L-Werte durch das Molvolumen eines idealen Gases bei 25°C (V'), Multiplikation mit V_L) und Ableitung nach der Zeit bestimmen:

$$(1) \qquad v'_{max} = \frac{\Delta C_L \cdot V_L}{t \cdot V'}$$

Dimension von v'_{max}: µmol/h

Um die wirkliche Maximalgeschwindigkeit (v_{max}) des Metabolismus zu erhalten, muß auch die Menge der untersuchten Substanz berücksichtigt werden, die sich nach Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes im Tier angereichert hat (Phase A).

Durch Einsetzen des imaginären Verteilungsvolumens (V_i)

$$(2) \qquad V_i = V_L + K_{Gl} \cdot V_T$$

anstelle von V_L in Gleichung (1) ließ sich v_{max} berechnen, unter Berücksichtigung der Anreicherung des untersuchten Stoffes im Organismus:

$$(3) \qquad v_{max} = \frac{\Delta C_L}{t} \cdot \frac{V_i}{V'}$$

Dimension von v_{max}: µmol/h

Um weitere Allgemeingültigkeit zu erreichen, wurde v_{max} auf 1 kg Körpergewicht (G_T) bezogen.

$$(4) \qquad \frac{v_{max} \cdot 10^3}{G_T} = \frac{\Delta C_L}{t} \cdot \frac{V_i}{V'} \cdot \frac{10^3}{G_T}$$

Dimension von $\frac{v_{max} \cdot 10^3}{G_T}$: µmol/h · kg

Die Einführung des Faktors 10^3 ist nötig, da von g auf kg umgerechnet wird.

Der Abschnitt C der Meßkurve folgt einer Kinetik 1. Ordnung mit der Geschwindigkeitskonstante k' (Dimension: h^{-1}). Es gilt hierbei:

$$(5) \qquad C_L = C_{L(f0)} \cdot e^{-k't}$$

C_L ist die Konzentration des Stoffes im Luftraum des Expositionssystems zur Zeit t (gemessen in ppm); $C_{L(f0)}$ ist die fiktive Anfangskonzentration (ebenfalls in ppm) zur Zeit t = 0. Die Konstanten $C_{L(f0)}$ und k' wurden durch Anpassung einer e-Funktion an die gemessenen Werte mittels eines Rechner-Programmes bestimmt.

Die Ableitung der Gleichung (5) nach der Zeit lautet:

$$(6) \qquad \frac{d\,C_L}{d\,t} = - C_{L(f0)} \cdot k' \cdot e^{-k't} = v'_{(t)}$$

Dimension von $v'_{(t)}$: ppm/h

Die Geschwindigkeit der Elimination (in µmol/h) aus dem

Luftraum des Systems zur Zeit t ($v'_{(t)}$) ergibt sich nach Umrechnen von $C_{L(f0)}$ in µmol/ml (durch Division durch das Molvolumen eines idealen Gases bei 25°C (V') und Multiplikation mit V_L):

$$(7) \qquad v'_{(t)} = - \frac{C_{L(f0)} \cdot V_L}{V'} \cdot k' \cdot e^{-k't}$$

Dimension von $v'_{(t)}$: µMol/h

Um die wirkliche Momentangeschwindigkeit ($v_{(t)}$) der metabolischen Elimination auszurechnen, muß wieder die Anreicherung der Substanz im Organismus berücksichtigt werden. Dies geschieht durch Einsetzen des Verteilungsvolumens V_i aus Gleichung (3) in Gleichung (7) anstelle von V_L:

$$(8) \qquad v_{(t)} = - \frac{C_{L(f0)} \cdot V_i}{V'} \cdot k' \cdot e^{-k't}$$

Dimension von $v_{(t)}$: µMol/h

Bezogen auf ein Körpergewicht von 1 kg ergibt sich:

$$(9) \qquad \frac{v_{(t)} \cdot 10^3}{G_T} = - \frac{C_{L(f0)} \cdot V_i \cdot 10^3}{V' \cdot G_T} \cdot k' \cdot e^{-k't}$$

Dimension von $v_{(t)}/GT \cdot 10^{-3}$: µmol/h · kg

Die Clearance (Cl) ist:

$$(10) \qquad k' \cdot V_i$$

Dimension von Cl: ml/h

Die Clearance, auf 1 kg Tiergewicht bezogen, ist:

$$(11) \qquad \frac{Cl \cdot 10^3}{G_T} = k' \cdot V_i \cdot \frac{10^3}{G_T}$$

3. ERGEBNISSE

3.1. Pharmakokinetik halogenierter Äthylene bei der Ratte

3.1.1. Abnahme der Gaskonzentrationen halogenierter Kohlenwasserstoffe im Expositionssystem

Wenn Tiere in dem beschriebenen geschlossenen Expositionssystem (2.3.2.) einer Anfangsgaskonzentration an halogeniertem Kohlenwasserstoff ausgesetzt waren, die über der Sättigungskonzentration lag, dann ergaben sich für alle untersuchten Stoffe ähnliche Konzentrations-Zeit-Kurven, deren Verlauf unter (2.9.) erklärt wurde. Diese Kurven ließen sich in 3 Phasen A, B und C unterteilen, deren rechnerische Analyse es erlaubte, das Verteilungsgleichgewicht, die kinetischen Daten der Aufnahme des jeweiligen Gases in den Tierorganismus und die Metabolisierungsgeschwindigkeiten ober- und unterhalb des jeweiligen Sättigungspunktes zu bestimmen (2.9.1. bzw. 2.9.2.). Die hier verwendeten Abkürzungen werden auf den Seiten 1-3 erklärt.

Vinylidenfluorid, Vinylfluorid und trans-1,2-Dichloräthylen wurden nur extrem langsam metabolisiert. Bei diesen Stoffen wurde der Sättigungspunkt (Sp) - also der Punkt des Übergangs der Kurve des Metabolismus von nullter zu 1. Ordnung - rechnerisch ermittelt unter der Annahme, daß sich die Kinetik dieser drei Substanzen so verhalte wie die der anderen untersuchten Gase. Bei sehr hoher Konzentration im System wurde v_{max} ermittelt. Die Konstanten der e-Funktion wurden durch Messung bei niedrigen Gaskonzentrationen bestimmt.

Wenn der Metabolismus der erwähnten 3 Stoffe analog zu dem der anderen Stoffe verläuft, dann schneidet die e-Funktion die Funktion nullter Ordnung bei der Konzentration, bei der

$$\frac{v_{(t)}}{G_{TC}} = \frac{v_{max}}{G_{TB}} \qquad \text{ist.}$$

Durch Einsetzen von v_{max} als $v_{(t=0)}$ in die Funktion 1. Ordnung ergibt sich aus (1), (4) und (9) in 2.9.2. unter Berücksichtigung, daß dann $C_{L(f0)} = Sp$ gesetzt wird:

$$\frac{v_{(t=0)} \cdot 10^3}{G_{TC}} = \frac{v_{max} \cdot 10^3}{G_{TB}} = \frac{Sp \cdot 10^3 \cdot V_{iC}}{G_{TC} \cdot V'} \cdot k' \cdot e^{-k' \cdot 0}$$

$$\frac{v_{max} \cdot 10^3}{G_{TB}} = \frac{\Delta C_L \cdot V_{iB} \cdot 10^3}{t \cdot V' \cdot G_{TB}} = \frac{Sp \cdot 10^3 \cdot V_{iC}}{G_{TC} \cdot V'} \cdot k'$$

$$\frac{v_{max} \cdot G_{TC} \cdot V'}{G_{TB} \cdot k' \cdot V_{iC}} = Sp$$

bzw.

$$\frac{\Delta C_L \cdot V_{iB} \cdot G_{TC}}{t \cdot G_{TB} \cdot V_{iC} \cdot k'} = Sp$$

Hierbei sind Sp der Sättigungspunkt, ausgedrückt als ppm im Luftraum, G_{TB} das Körpergewicht der Tiere beim ersten Versuch (Kinetik nullter Ordnung), G_{TC} das Körpergewicht der Tiere beim zweiten Versuch (Kinetik erster Ordnung) und V_{iB} bzw. V_{iC} die entsprechenden imaginären Verteilungsvolumina.

$\Delta C_L/t$ ist die Konzentrationsänderung im Gasraum des Systems im Verlaufe der Zeit t bei dem Versuch im Bereich der Kinetik nullter Ordnung.

3.1.1.1. Vinylidenfluorid

Vinylidenfluorid: MG: 64,04
Kp: -84 bis -86°C
F : -144°C
farbloses Gas, in Alkohol und Äther löslich

Das reine Gas (1,1-Difluoräthylen) wurde wie in (2.4.2.) beschrieben entnommen und in das Expositionssystem injiziert. Die gaschromatographische Analyse wurde bei 120°C Säulentemperatur mit einer Retentionszeit von 1,2 min vorgenommen. Da die Äquilibrierung zwischen Gasphase und Organismus sehr schnell abläuft und hierbei nur sehr wenig Vinylidenfluorid aufgenommen wird, wurde für die Messung der unter (2.3.2.) beschriebene Einsatz verwendet, der eine sehr schnelle Verteilung des eingespritzten Gases im Gasraum garantierte.

Abbildung 10 zeigt die Abnahme der Vinylidenfluoridkonzentration im Gasraum bei drei verschiedenen Versuchen.

Wie aus Abb. 10a ersichtlich, nahm die Gaskonzentration im Expositionssystem innerhalb von 3 Stunden linear von 204 (extrapoliert) auf 198 ppm ab.

Die Versuchsdaten waren:

$C_{L(0)}$: 207 ppm
V_L : 9690 ml
V_T : 610 ml
G_T : 610 g
Anzahl der Tiere: 3 männl. Wistar-Ratten
v'_{max} : 1,8 ppm/h (r = 0,98)

Abb. 10b zeigt eine wesentlich langsamere Abnahme der Vinylidenfluoridkonzentration im Expositionssystem bei geringer Anfangskonzentration des Gases.

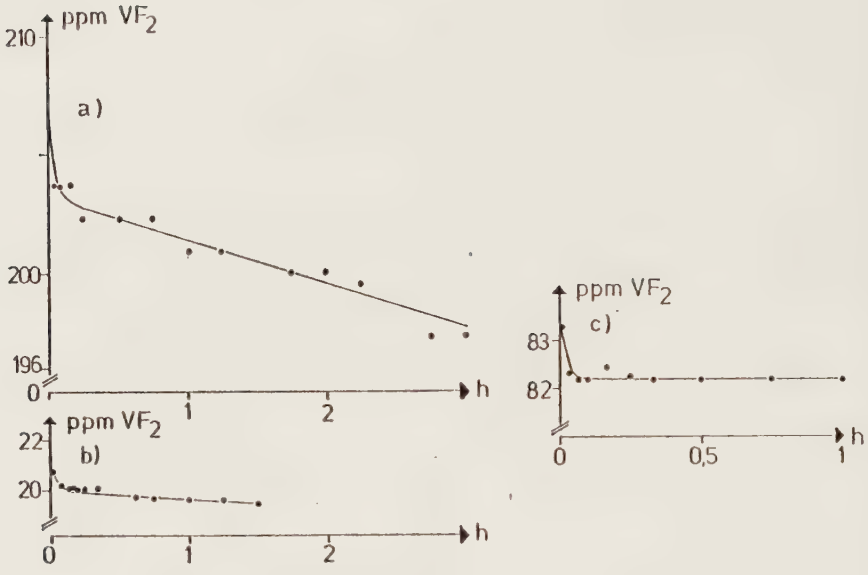


Abb. 10: Abnahme der Konzentration von Vinylidenfluorid mit je 3 Wistar-Ratten im Expositionssystem:
a) bei hoher Anfangskonzentration (207 ppm)
b) bei niedriger Anfangskonzentration (21 ppm)
c) nach Vorbehandlung der Tiere mit 100 mg/kg Körpergewicht Dithiocarb; Anfangskonzentration von 83,7 ppm

Die Versuchsbedingungen waren:

$C_{L(O)}$: 21 ppm
V_L : 9600 ml
V_T : 700 ml
G_T : 700 g
Anzahl der Tiere: 3 männl. Wistar-Ratten
k' : 0,021 h^{-1} (r = 0,93)

Die Meßwerte nach Einstellung des Verteilungsgleichgewich-

tes ließen sowohl eine Deutung der Kurve als e-Funktion wie auch als Gerade zu. Wird die Kurve in Analogie zu den gemessenen Kurven der anderen untersuchten halogenierten Äthylene im niedrigen ppm-Bereich als Funktion erster Ordnung angesehen, so läßt sich - wie in 3.1.1. erklärt - der Sättigungspunkt für Vinylidenfluorid mit 100 ppm berechnen.

Aus derKurve in Abb. 10c, die bei einstündiger Messung eine 100 %ige Hemmung des Vinylidenfluorid-Metabolismus durch Dithiocarb zeigte, ließen sich - wie in 2.9.1. erklärt - die kinetischen Daten der Aufnahme des Gases aus der Luft in den Organismus berechnen.

Die Versuchsbedingungen im System waren:

$C_{L(O)}$: 83,7 ppm
V_L : 9600 ml
V_T : 705 ml
G_T : 705 g
Anzahl der Tiere: 3 männl. Wistar-Ratten, 10 min vor Versuchsbeginn mit 100 mg/kg Dithiocarb vorbehandelt

Durch Messung bestimmt:
k : 30,65 h^{-1} (r = 0,94)
K_{Gl} : 0,23

3.1.1.2. Vinylfluorid

Vinylfluorid: MG: 46,05
Kp: -72,2°C
F : -160,5°C
farbloses Gas, unlöslich in Wasser, löslich in Äther und Alkohol

Vinylfluorid (Monofluoräthylen) wurde wie in 2.4.2. beschrieben in das Expositionsgefäß injiziert. Die gaschromatographische Analyse wurde bei 70°C Säulentemperatur mit einer Retentionszeit von 2,1 min durchgeführt. Da sich bei der Gasaufnahme in den Organismus das Verteilungsgleichge-

wicht sehr schnell einstellte, wurde für diese Messungen ebenfalls der unter 2.3.2. beschriebene Einsatz verwendet; häufigere Messungen waren möglich durch Steigerung der Säulentemperatur auf 180°C (Retentionszeit = 1,0 min).

Abb. 11 zeigt die Abnahme der Vinylfluoridkonzentrationen im Gasraum bei vier verschiedenen Versuchen.

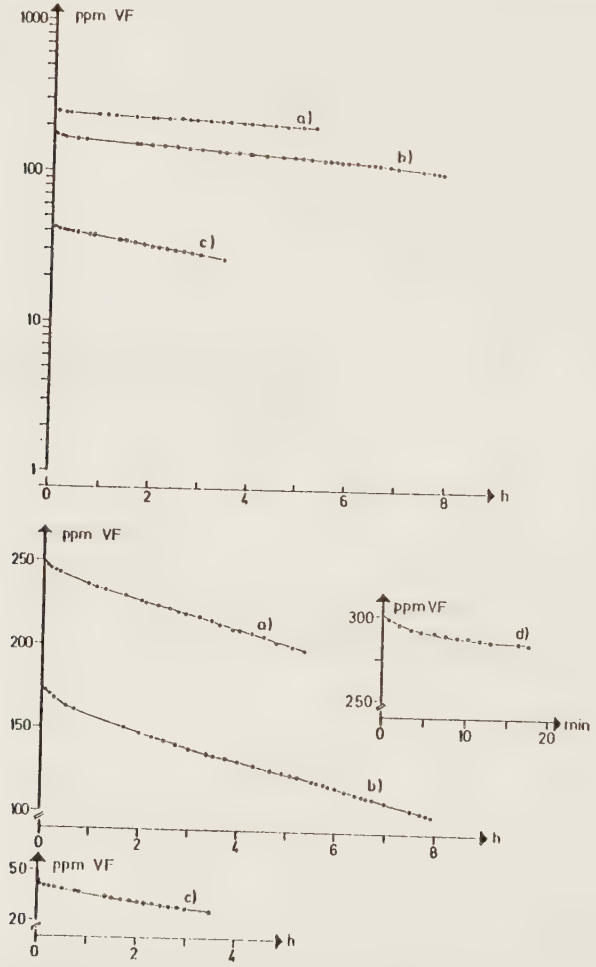


Abb. 11: Abnahme der Konzentration von Vinylfluorid mit je 3 Ratten im Expositionssystem
a,b) Konzentrationsabnahmen im V_{max}-Bereich (nullter Ordnung)
c) Konzentrationsabnahme im Bereich erster Ordnung
d) anfängliche Konzentrationsabnahme im System während der Verteilungsphase

Man erkennt im Konzentrationsbereich zwischen 240 und 200 ppm (Kurve 11 a) und im Konzentrationsbereich zwischen 170 und 100 ppm (Kurve 11 b) eine lineare Abnahme der Gaskonzentration. Kurve 11 c zeigt zwischen 40 und 28 ppm eine Konzentrationsabnahme nach einer Kinetik erster Ordnung. Die Kurve 11 d zeigt die Aufnahmekinetik des Gases in den Organismus. Für diese Messung war eine Hemmung des Metabolismus nicht notwendig.

Die Versuchsbedingungen waren:

Kurve a): $C_{L(O)}$ ca. 270 ppm; V_L 9745 ml;
V_T 557 ml; G_T 557 g
Anzahl der Tiere: 3 männl. Wistar-Ratten
v'_{max}: 10,4 ppm/h; r = 0,999

Kurve b): $C_{L(O)}$ 200 ppm; V_L 9850 ml;
V_T 450 ml; G_T 450 g
Anzahl der Tiere: 3 männl. Wistar-Ratten
v'_{max}: 8 ppm/h; r = 0,986

Kurve c): $C_{L(O)}$ ca. 50 ppm; V_L 9775 ml;
V_T 525 ml; G_T 525 g;
Anzahl der Tiere: 3 männl. Wistar-Ratten
k': 0,13176 h^{-1}; r = 0,9997

Kurve d): $C_{L(O)}$ 300 ppm; V_L 9625 ml;
V_T 675 ml; G_T 675 g
Anzahl der Tiere: 3 männl. Wistar-Ratten
Durch Messung bestimmt:
k: 7,303 h^{-1}; K_{Gl}: 0,91; r = 0,99

Es wurden zusätzlich zu den hier abgebildeten Meßkurven noch 2 weitere Versuche mit Vinylfluorid durchgeführt. Eine Messung wurde im v_{max}-Bereich zwischen 400 und 340 ppm vorgenommen. Es errechnete sich, bezogen auf das Körpergewicht der Tiere, die gleiche Maximalgeschwindigkeit wie aus den Messungen 11 a und b. Eine weitere Messung wurde zwischen 10 und 5 ppm durchgeführt. Sie ergab, auf das Körpergewicht bezogen, die gleiche Clearance wie Kurve 11 c.

Aus Abb. 11 läßt sich erkennen, daß der Sättigungspunkt des Metabolismus von Vinylfluorid zwischen 45 und 100 ppm liegen muß. Er errechnet sich nach dem in 3.1.1. beschriebenen Verfahren mit 85 ppm.

3.1.1.3. Vinylchlorid

Vinylchlorid: MG: 62,5
Kp: $-13,9^{\circ}C$
F : $-159,7^{\circ}C$
farbloses Gas, in Wasser sehr wenig, in Alkohol und Äther leicht löslich

Vinylchlorid (Monochloräthylen) wurde im gasförmigen Zustand, wie in 2.4.2. beschrieben, in das Expositionssystem eingespritzt. Die gaschromatographische Analyse wurde bei $145^{\circ}C$ Säulentemperatur durchgeführt. Die Retentionszeit betrug 2,3 min. Die Aufnahmekinetik des Gases in den Organismus bis zur Einstellung des Verteilungsgleichgewichts wurde unter Zuhilfenahme des unter 2.3.2. beschriebenen Einsatzes durchgeführt.

Abb. 12 zeigt die Abnahme der Vinylchloridkonzentration im Expositionssystem bei Exposition von 3 Wistar-Ratten, die 10 min vor Versuchsbeginn mit Dithiocarb (siehe 2.3.1.) vorbehandelt worden waren.

Diese Messung diente der Bestimmung der Aufnahmegeschwindigkeit von Vinylchlorid in den Organismus. Da Vinylchlorid relativ schnell verstoffwechselt wird, war es notwendig, hierzu den Metabolismus weitgehend zu hemmen.

Die Versuchsbedingungen waren:

$C_{L(0)}$ 140 ppm; V_L 9600 ml; V_T 720 ml;
G_T 720 g; Anzahl der Tiere: 3 männl. Wistar-Ratten
gemessen wurde: K_{Gl}: 5,28; k: 12,7 h^{-1}, r = 0,9

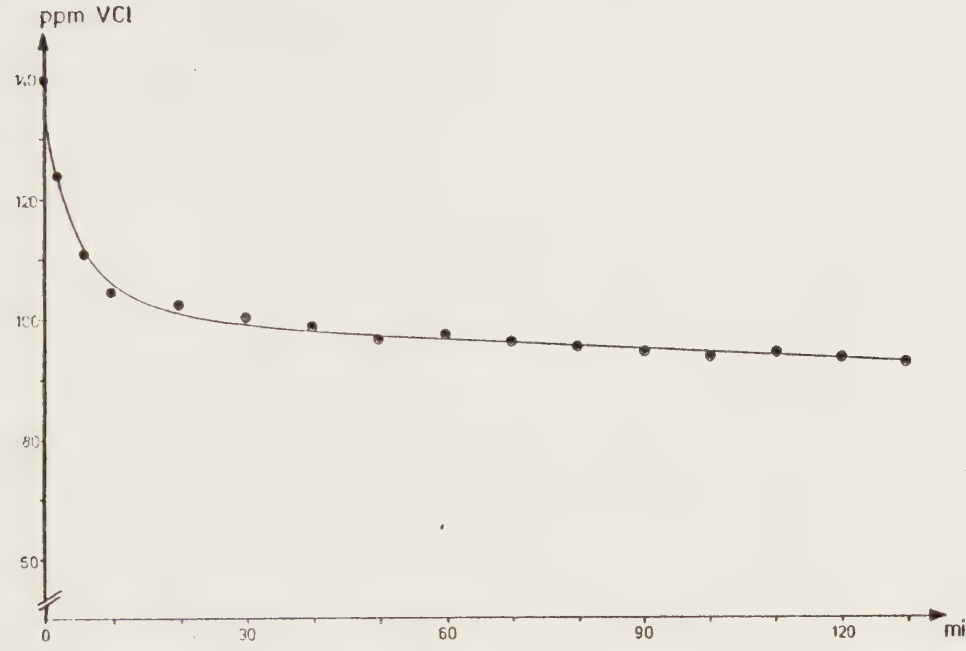


Abb. 12: Konzentrationsabnahme im Gasraum des Systems bei Exposition von 3 Wistar-Ratten mit Vinylchlorid. Die Tiere waren 10 min vor Versuchsbeginn mit 100 mg/kg Dithiocarb vorbehandelt worden.

In Abb. 13 ist eine Konzentrations-Zeit-Kurve von Vinylchlorid dargestellt, ohne daß der Metabolismus gehemmt worden war.

Die Abbildung zeigt nach Einstellung des Verteilungsgleichgewichts einen linearen Abfall der Gaskonzentration bis herab zu 250 ppm. Ab diesem Sättigungspunkt nimmt die Gaskonzentration nach einer Kinetik erster Ordnung ab.

Die Versuchsbedingungen waren:

$C_{L(0)}$ 1450 ppm; V_L 9550 ml
V_T 750 ml; G_T 750 g;
Anzahl der Tiere: 3 männl. Wistar-Ratten

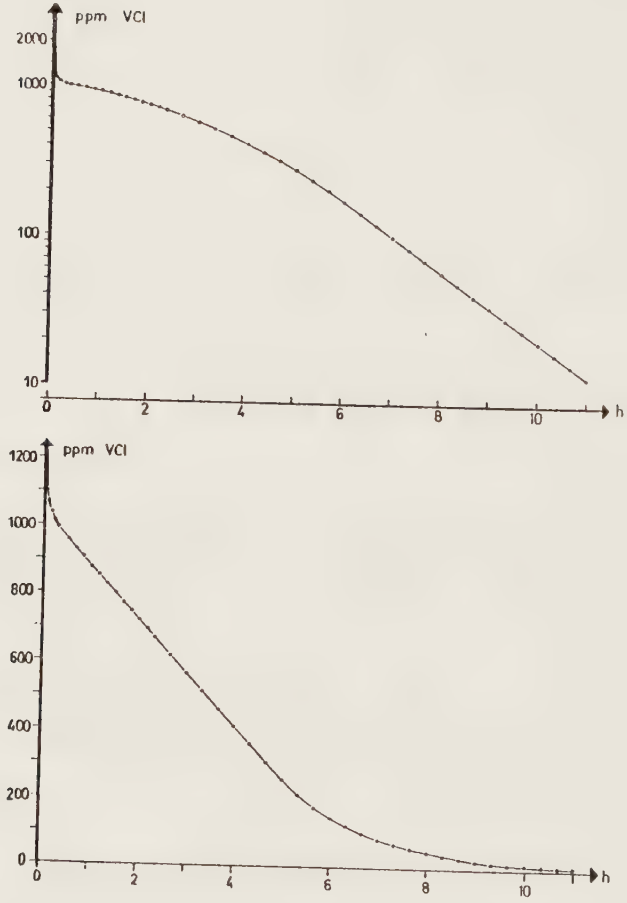


Abb. 13: Abnahme der Konzentration von Vinylchlorid mit 3 Ratten im Expositionssystem

Durch die Messung wurden bestimmt:

v'_{max}: 156 ppm/h

k' : 0,60 h^{-1}

r im Bereich der Kinetik 1. Ordnung: 0,999

r im Bereich der Kinetik 0. Ordnung: 0,999

3.1.1.4. Vinylbromid

Vinylbromid: MG : 106,96
Dichte: 1,4933
Kp : 16°C
F : -140°C
farblose Flüssigkeit bzw. farbloses Gas

Um Vinlybromid (Monobromäthylen) in gasförmigem Zustand zu erhalten, wurde es zunächst als Flüssigkeit im Eisbad (Abzug!) gekühlt. Mit einer Einmalspritze wurde die Flüssigkeit so langsam aufgezogen, daß sie dabei in die Spritze hinein verdampfte. Die gaschromatographische Analyse wurde bei 190°C Säulentemperatur mit einer Retentionszeit von 3,0 min bzw. bei 170°C mit einer Retentionszeit von 3,3 min durchgeführt. Zur Messung der Aufnahme des Gases bis zur Gleichgewichtseinstellung zwischen Organismus und Gasphase wurde der unter 2.3.2. beschriebene Einsatz verwendet.

Abb. 14 zeigt die Abnahme der Vinylbromidkonzentration im Expositionssystem bei Exposition von 3 Sprague-Dawley-Ratten, die 2 Stunden vor Versuchsbeginn mit 6-Chlor-1,2,3-benzothiadiazol vorbehandelt worden waren (wie unter 2.3.1. beschrieben).

Da 6-Chlor-1,2,3-benzothiadiazol den Metabolismus von Vinylbromid sehr stark hemmt, ließ sich durch diesen Versuch die Kinetik der Aufnahme von Vinylbromid in den Organismus bis zur Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes bestimmen.

Die Versuchsbedingungen waren:

$C_{L(O)}$ 102 ppm; V_L 9565 ml;
V_T 735 ml; G_T 735 g
Anzahl der Tiere: 3 männl. Sprague-Dawley-Ratten
Gemessen wurde: K_{Gl}: 11,3, k: 13,8 h^{-1}, r = 0,986

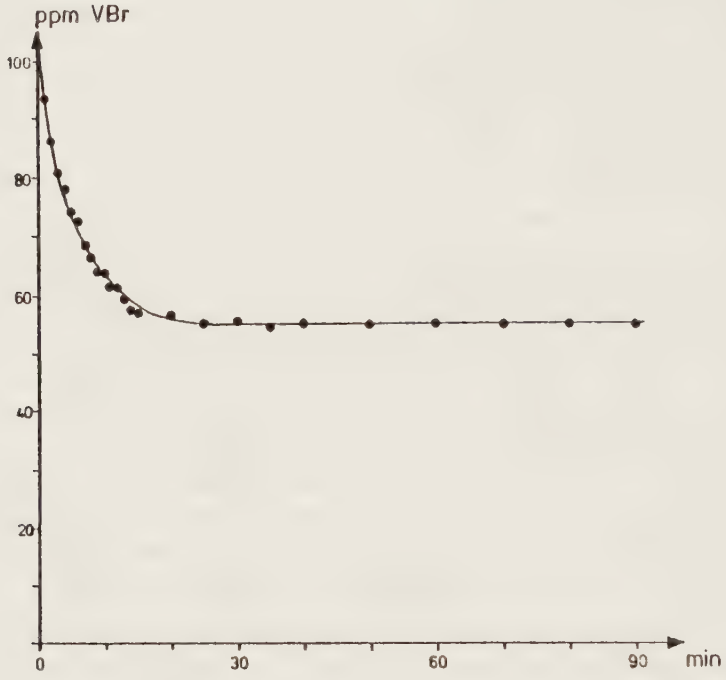


Abb. 14: Abnahme der Vinylbromidkonzentration im Gasraum des Systems bei Exposition von 3 Sprague-Dawley-Ratten, die 2 h vor Versuchsbeginn mit 200 mg/kg 6-Chlor-1,2,3-benzothiadiazol vorbehandelt worden waren

In Abb. 15 ist die Abnahme der Vinylbromidkonzentration im Expositionssystem von einer Anfangskonzentration von 400 ppm bis zu einer Konzentration von 2,5 ppm nach 10 h 40' dargestellt.

Die Abbildung zeigt nach Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes einen Abfall der Gaskonzentration im Luftraum nach einer Kinetik nullter Ordnung im Bereich zwischen 225 ppm und 55 ppm. Ab diesem Sättigungspunkt nimmt die Gaskonzentration nach einer Kinetik 1. Ordnung ab.

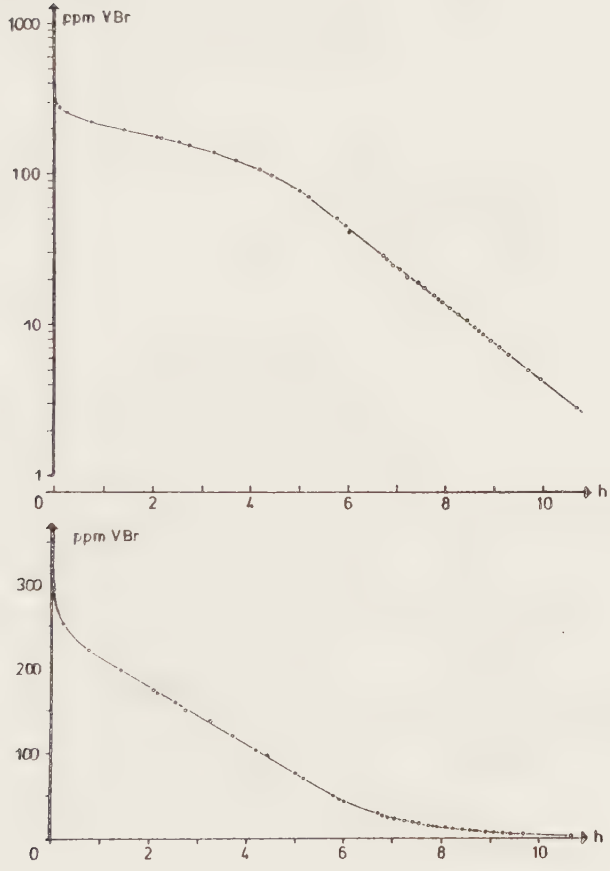


Abb. 15: Abnahme der Vinylbromidkonzentration im Gasraum des Systems bei Exposition von 3 Wistar-Ratten

Die Versuchsbedingungen waren:

$C_{L(O)}$ 400 ppm; V_L 9765 ml;
V_T 535 ml; G_T 535 g
Anzahl der Tiere: 3 männl. Wistar-Ratten

Durch die Messung wurden bestimmt:

v_{max}: 34,1 ppm/h; r = 0,999
k' : 0,5983 h^{-1}, r = 0,999

Der Sättigungspunkt lag bei 55 ppm.

3.1.1.5. Vinylidenchlorid

Vinylidenchlorid: MG : 96,95
Dichte: 1,213
Kp : 32°C
F : -122,5°C
farblose Flüssigkeit, in Wasser nicht, in organischen Lösungsmitteln löslich

Vinylidenchlorid (1,1-Dichloräthylen) wurde als Dampf-Luftgemisch zugegeben wie in 2.4.3. beschrieben. Gaschromatographisch analysiert wurde bei 190°C Säulentemperatur mit einer Retentionszeit von 2,8 min. Zur Messung der Kinetik der Aufnahme der Substanz in den Organismus wurde der unter 2.3.2. beschriebene Einsatz verwendet.

Die Tiere waren wie unter 2.3.1. beschrieben mit 6-Chlor-1,2,3-benzothiadiazol vorbehandelt, um den Metabolismus von Vinylidenchlorid so weit wie möglich zu blockieren.

Die Versuchsbedingungen waren:

$C_{L(0)}$ 750 ppm; V_L 9400 ml;
V_T 900 ml; G_T 900 g;
Anzahl der Tiere: 3 männl. Sprague-Dawley-Ratten

Bestimmt wurden:

K_{Gl}: 7,8
k : 2,88 h^{-1}, r = 0,99

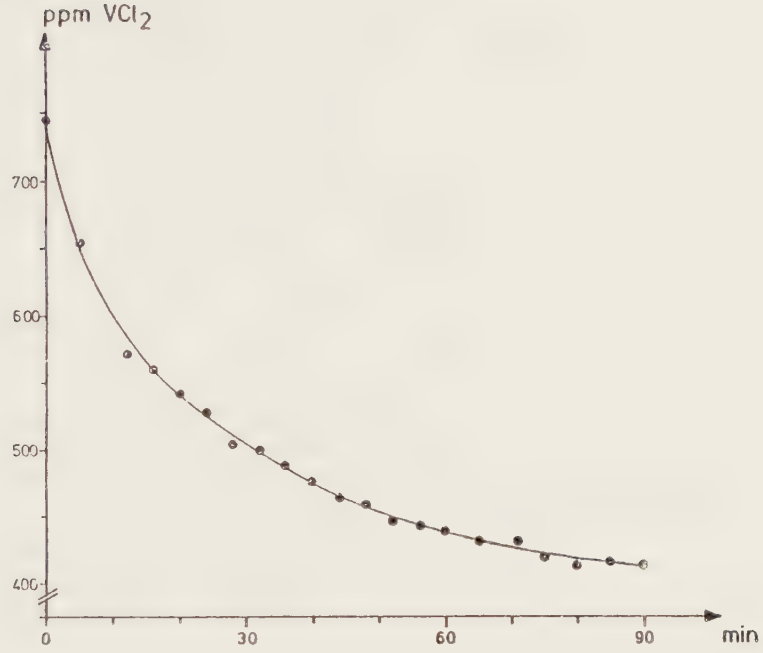


Abb. 16: Abnahme derVinylidenchloridkonzentration im Gasraum des Systems bei Exposition von 3 Sprague-Dawley-Ratten, welchen eine Stunde vor Versuchsbeginn 6-Chlor-1,2,3-benzothiadiazol (200 mg/kg) i.p. appliziert worden war

In Abb. 17 ist die Abnahme der Vinylidenchloridkonzentration im System dargestellt bei Exposition von 3 Wistar-Ratten, deren Metabolismus nicht gehemmt worden war.

Nach Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes nimmt die Konzentration zwischen 290 und 150 ppm linear ab. Unter 150 ppm nimmt die Dampfkonzentration nach einer Kinetik erster Ordnung ab.

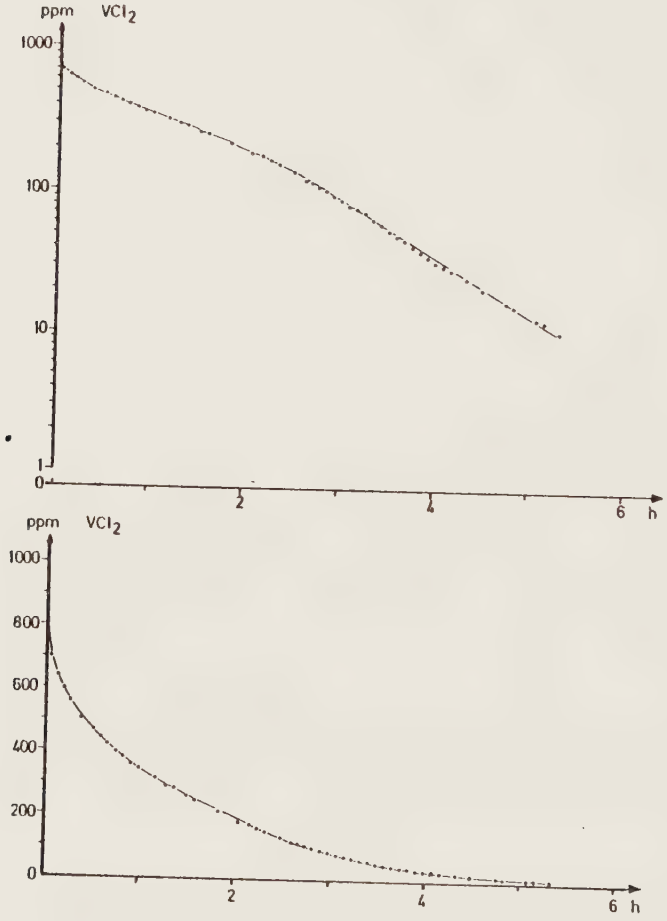


Abb. 17: Abnahme der Konzentration von Vinylidenchlorid in der Atmosphäre des Expositionssystems bei Exposition von 3 Wistar-Ratten

Die Versuchsdaten waren:

$C_{L(O)}$ 815 ppm; V_L 9450 ml;
V_T 850 ml; G_T 850 g;
Anzahl der Tiere: 3 männl. Wistar-Ratten

Durch den Versuch wurden bestimmt:

v_{max}: 131 ppm · h^{-1}; r = 0,997
Sp : 150 ppm; k': 0,9 h^{-1}; r = 0,999

3.1.1.6. trans-1,2-Dichloräthylen

trans-Dichloräthylen: MG : 96,95
Dichte: 1,257
Kp : 47,8°C
F : -50°C
farblose Flüssigkeit

Trans-Dichloräthylen wurde als Dampf-Luftgemisch nach 2.4.3. in das System injiziert. Die gaschromatographische Analyse geschah bei 190°C bzw. 200°C Säulentemperatur mit Retentionszeiten von 3,5 min resp. 3,0 min.

Abb. 18 zeigt 2 verschiedene Meßkurven.

Ein Versuch wurde bei hoher Dampfkonzentration, der andere bei niedriger Anfangskonzentration des Dampfes im Expositionssystem ausgeführt. In beiden Fällen wurden je 3 Wistar-Ratten dem Dampf ausgesetzt.

Bei hoher Konzentration verläuft die Metabolisierung nach einer Kinetik nullter Ordnung, bei niedriger Konzentration nach einer Kinetik 1. Ordnung. Da trans-Dichloräthylen nur sehr langsam metabolisiert wird, war es nicht nötig, zur Messung der Verteilungs-Kinetik den Metabolismus zu blokkieren.

Die Versuchsbedingungen waren wie folgt:

1) Hohe Anfangskonzentration:
$C_{L(0)}$ 922 ppm; V_L 9670 ml;
V_T 630 ml; G_T 630 g
Anzahl der Tiere: 3 männl. Wistar-Ratten

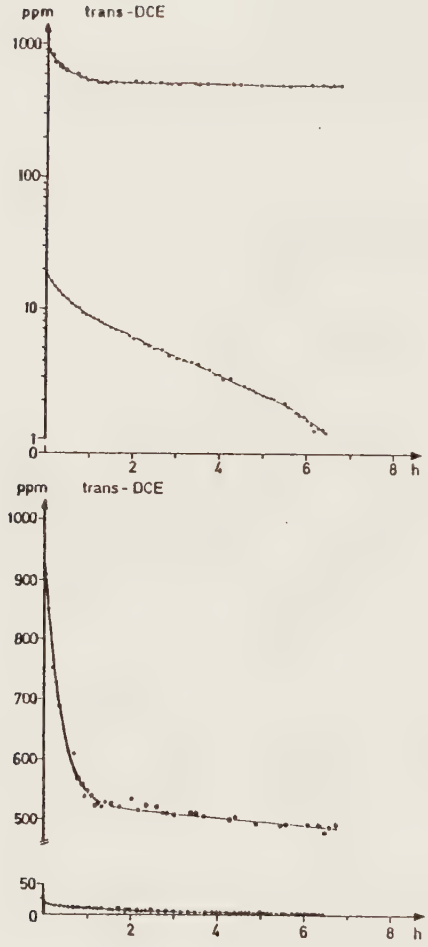


Abb. 18: Abnahme der Dampfkonzentration von trans-Dichloräthylen im System bei Exposition von jeweils 3 Wistar-Ratten

Aus der Meßkurve wurden bestimmt:

K_{Gl}: 11,5; k: 2,726 h^{-1}

v'_{max}: 6,605 ppm/h; r im Bereich O. Ordnung: O,993

r der Aufnahmekurve: O,989

2) Niedrige Anfangskonzentration:

$C_{L(O)}$ 22,6 ppm; V_L 9850 ml
V_T 450 ml; G_T 450 ml

Aus der gemessenen Kurve wurden berechnet:

K_{Gl}: 11,5
k' zwischen 5,4 und 1,5 ppm: 0,323 h^{-1}
r der e-Funktion: 0,995

Aus den beiden Kurven zusammen läßt sich der Sättigungspunkt berechnen: Sp = 15 ppm (siehe 3.1.1.).

3.1.1.7. cis-1,2-Dichloräthylen

cis-Dichloräthylen: MG : 96,95
Dichte: 1,284
Kp : 61,0
F : -80,5°C
farblose Flüssigkeit, unlöslich in Wasser

Das käufliche cis-Dichloräthylen war mit trans-Dichloräthylen verunreinigt und mußte über eine Kolonne destilliert werden. Das Dampf-Luftgemisch wurde wie unter 2.4.3. beschrieben in das System injiziert. Die gaschromatographische Analyse wurde bei verschiedenen Säulentemperaturen durchgeführt. Die Retentionszeiten betragen: 4,5 min bei 190°C; 3,7 min bei 200°C und 3,2 min bei 210°C.

In Abb. 19 ist die Abnahme der cis-Dichloräthylen-Konzentration in der Gasphase des Expositionssystems dargestellt, bei Exposition von 3 Wistar-Ratten, deren oxidativer Fremdstoff-Metabolismus mit 5-Chlor-1,2,3-benzothiadiazol gehemmt worden war (siehe 2.3.1.).

Die Versuchsbedingungen waren:

$C_{L(O)}$ 46 ppm; V_L 9685 ml; V_T 615 ml; G_T 615 g;
Anzahl der Tiere: 3 männl. Wistar-Ratten

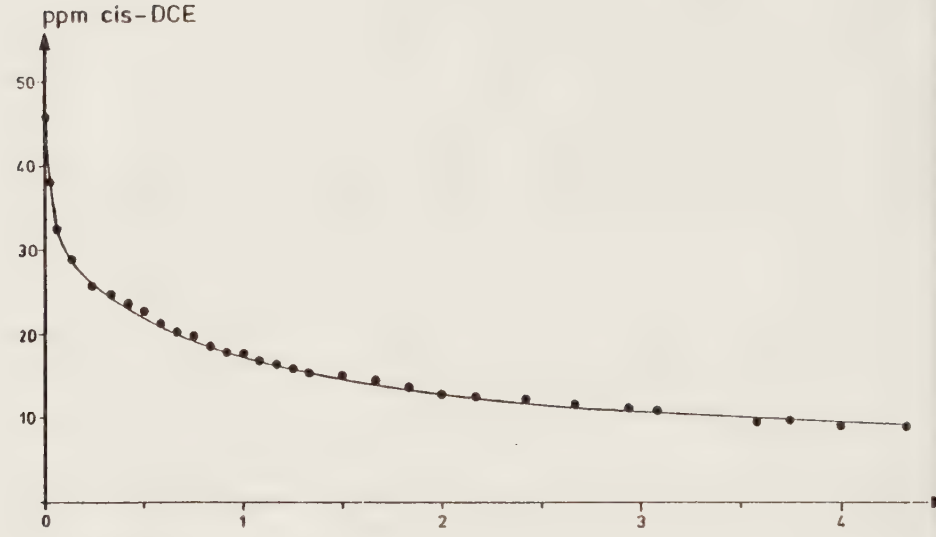


Abb. 19: Abnahme der Dampfkonzentration von cis-Dichloräthylen im System bei Exposition von 3 Wistar-Ratten, die mit 200 mg/kg 5-Chlor-1,2,3-benzothiadiazol vorbehandelt worden waren.

Aus der Messung wurden berechnet:

K_{Gl}: 21; k: 2,54; r = 0,973

In Abb. 20 ist die Abnahme der Konzentration von cis-Dichloräthylen im Expositionssystem zwischen einer Anfangskonzentration von 670 ppm und einer Endkonzentration von 2 ppm bei Exposition von 3 Wistar-Ratten dargestellt.

Wie aus der Abbildung zu entnehmen, ist das Verteilungsgleichgewicht nach 3 Stunden erreicht. Ab hier (150 ppm) nimmt die Gaskonzentration linear ab bis der Sättigungs-

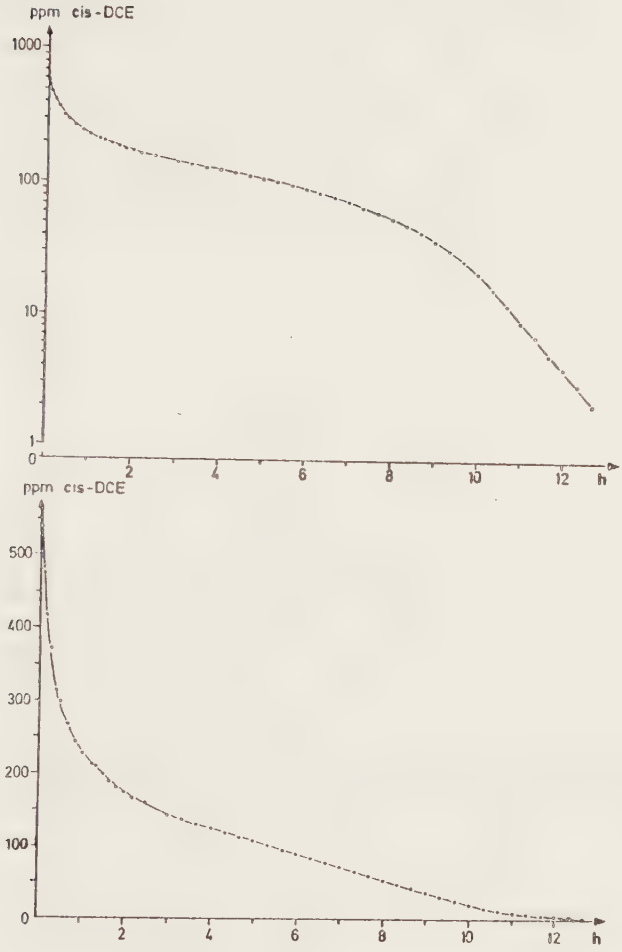


Abb. 20: Abnahme der cis-Dichloräthylenkonzentration im Gasraum mit 3 Wistar-Ratten im Expositionssystem

punkt (20 ppm) erreicht ist. Von diesem Punkt ab erfolgt die Abnahme der Dampfkonzentration nach einer Kinetik 1. Ordnung (bis zum Ende der Messung bei 2 ppm).

Die Versuchsbedingungen waren:

$C_{L(O)}$ 670 ppm; V_L 9620 ml; V_T 680 ml; G_T 680 g;
Anzahl der Tiere: 3 männl. Wistar-Ratten

Durch die Messung wurden bestimmt:

K_{Gl}: 20; k: 2,59 h^{-1}; r der Aufnahme: 0,995
v'_{max}: 18,18 ppm/h; r der linearen Funktion: 0,999
Sp: 20 ppm; k': 0,885 h^{-1}; r der e-Funktion: 0,999

3.1.1.8. Trichloräthylen

Trichloräthylen: MG : 131,40
Dichte: 1,4649
Kp : 87°C
F : -73°C
farblose, nicht brennbare Flüssigkeit, chloroformartig riechend, unlöslich in Wasser, mischbar mit org. Lösungsmitteln

Trichloräthylen (1,1,2-Trichloräthylen) wurde als Flüssigkeit nach 2.4.1. in das Expositionssystem injiziert. Die gaschromatographische Analyse wurde bei verschiedenen Säulentemperaturen durchgeführt. Die Retentionszeiten betragen 7,8 min bei 190°C, 6,6 min bei 200°C und 4,2 min bei 220°C. Da Trichloräthylen schnell metabolisiert wird, wurde die Kinetik der Aufnahme von Trichloräthylendampf in den Organismus bei gehemmtem Metabolismus gemessen.

Abb. 21 zeigt die Abnahme von Trichloräthylendampf im Expositionssystem bei Exposition von 3 Wistar-Ratten, die 1 Stunde vor Versuchsbeginn mit 6-Chlor-1,2,3-benzothiadiazol vorbehandelt worden waren, wie unter 2.3.1. beschrieben.

Die Versuchsbedingungen waren:

$C_{L(O)}$ 1400 ppm; V_L 9670 ml; V_T 630 ml; G_T 630 g;
Anzahl der Tiere: 3 männl. Wistar-Ratten

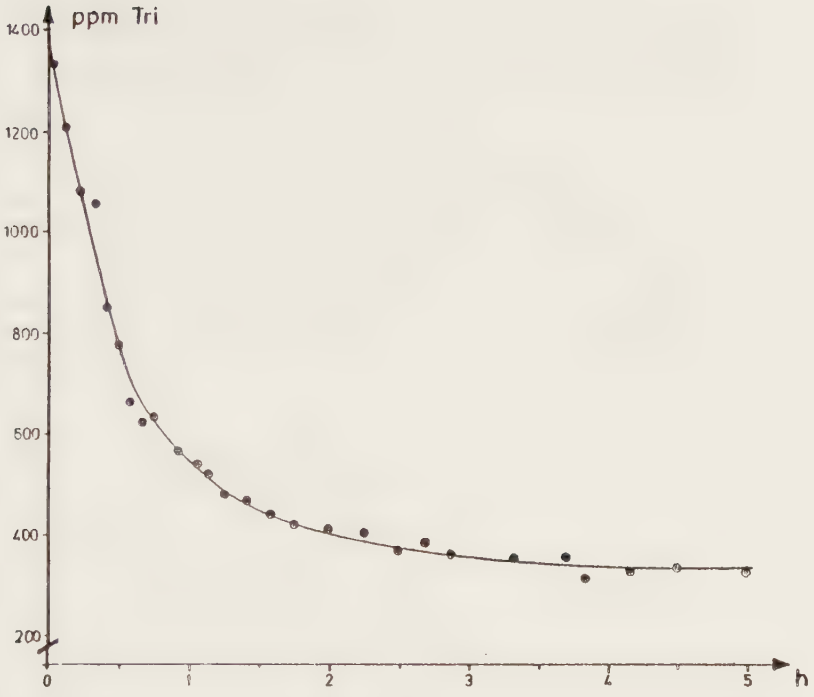


Abb. 21: Abnahme der Konzentration von Trichloräthylendampf im Expositionssystem bei Exposition von 3 Wistar-Ratten, denen 1 h vor Versuchsbeginn 6-Chlor-1,2,3-benzothiadiazol (200 mg/kg) i.p. appliziert worden war

Aus dem Versuch errechnete sich:

K_{Gl}: 52; k: 1,76 h^{-1}

Der Korrelationskoeffizient r war: 0,987

In der nächsten Abbildung (Abb. 22) ist die Abnahme der Trichloräthylenkonzentration in der Gasphase des Systems während eines Versuches ohne Hemmstoff dargestellt. Die Aufnahme des Tri-Dampfes bis zur Einstellung des Gleichgewichtes zwischen Organismus und umgebender Atmosphäre ist erst nach ungefähr 3 Stunden beendet. Dann fällt die Dampf-

konzentration linear ab bis zum Sättigungspunkt, der bei 65 ppm liegt. Die weitere Abnahme der Dampfkonzentration bis zum Ende des Versuches bei 10 ppm erfolgt nach einer Kinetik 1. Ordnung.

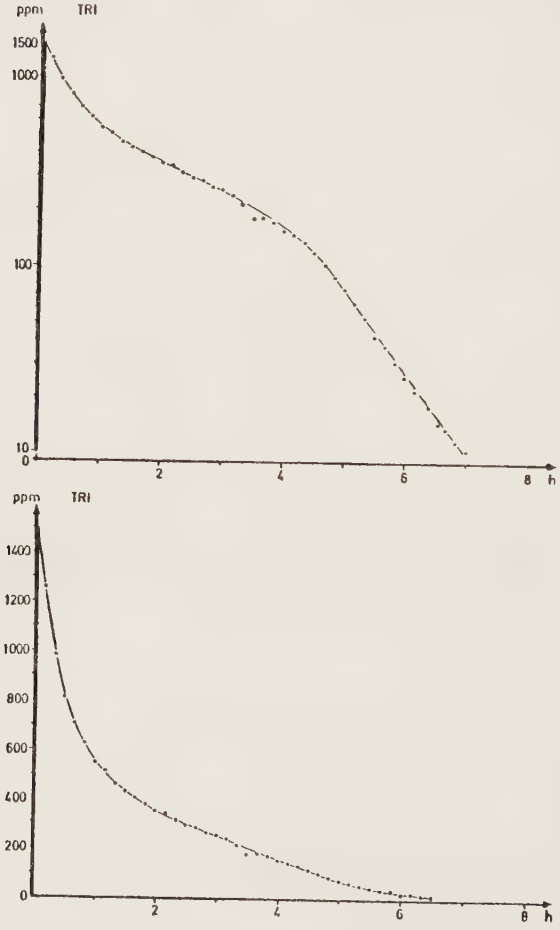


Abb. 22: Abnahme der Konzentration von Trichloräthylen in der Gasphase des Expositionssystems bei Exposition von 3 Wistar-Ratten

Die Versuchbedingungen waren:

$C_{L(O)}$ 1900 ppm; V_L 9750 ml; V_T 550 ml; G_T 550 g
Anzahl der Tiere: 3 männl. Wistar-Ratten

Durch den Versuch wurden bestimmt:

v'_{max}: 76,4 ppm/h;
Der Korrelationskoeffizient des linearen Teiles der Meßkurve war: r = 0,9988
Sp: 65 ppm; k': 1,18 h^{-1}
Der Korrelationskoeffizient des Teiles der Meßkurve, der eine e-Funktion zeigte, war: r = 0,998

3.1.1.9. Perchloräthylen

Perchloräthylen: MG : 165,83
Dichte: 1,624
Kp : 121°C
F : -19°C
farblose, charakteristisch riechende, nicht brennbare Flüssigkeit, in Wasser unlöslich, mit den meisten org. Lösungen mischbar

Perchloräthylen (1,1,2,2-Tetrachloräthylen) wurde als Flüssigkeit in das System gegeben, wie in 2.4.1. beschrieben. Vorversuche ohne Tiere ergaben, daß die geringen Mengen injizierter Flüssigkeit nach 30 min im Expositionssystem verdampft waren. Die gaschromatographische Analyse wurde bei 200°C durchgeführt. Die Retentionszeit betrug 11,5 min.

In 3 Versuchen mit Wistar-Ratten, deren oxidativer Fremdstoff-Metabolismus mit Dithiocarb gehemmt worden war, wie unter 2.3.1. beschrieben, wurde die Kinetik der Aufnahme von dampfförmigem Perchloräthylen gemessen. Auf die Abbildung eines dieser Versuche wird hier verzichtet, da die gemessenen Kurven bei gehemmtem Metabolismus sich kaum un-

terscheiden von den Kurven, die bei ungehemmtem Metabolismus ermittelt wurden.

In Abb. 23 ist die Abnahme der Konzentration von dampfförmigem Perchloräthylen bei Exposition von 3 Ratten im Expositionssystem dargestellt. Zu Versuchsbeginn waren 50 µl flüssiges Perchloräthylen in den Exsikkator injiziert worden, was einer theoretischen Anfangskonzentration von 1175 ppm dampfförmigen Perchloräthylens entsprach.

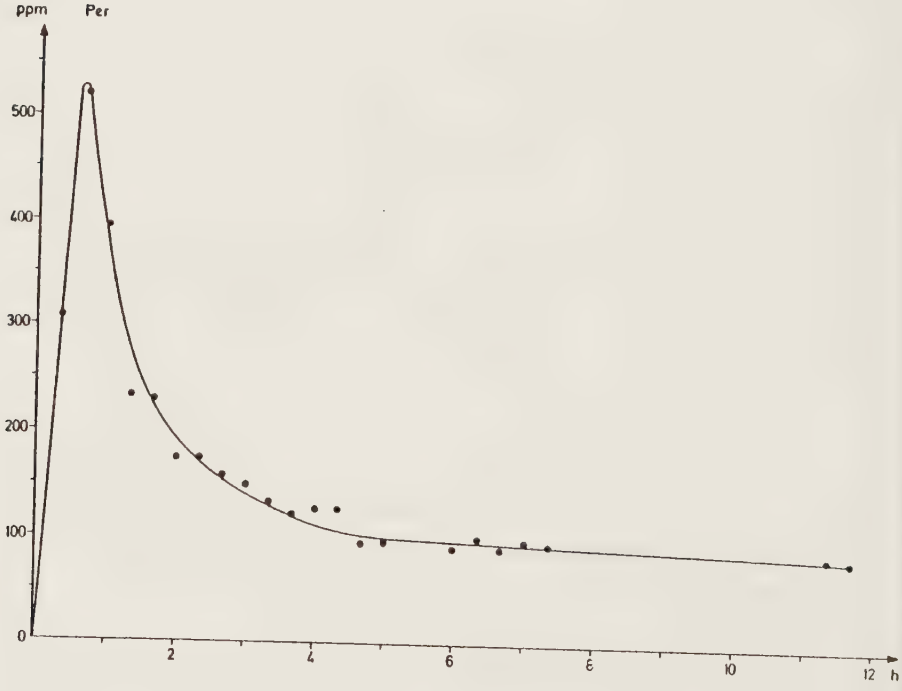


Abb. 23: Abnahme der Konzentration von Perchloräthylen in der Gasphase des Expositionssystems bei Exposition von 3 Wistar-Ratten

Die Versuchsbedingungen waren:

$C_{L(O)}$ 1175 ppm; V_L 9340 ml; V_T 785 ml; G_T 785 g;
Anzahl der Tiere: 3 männl. Wistar-Ratten

Durch den Versuch wurden bestimmt:

k: 0,86 h^{-1}; der Korrelationskoeffizient der Aufnahmekurve war: r = 0,95;

K_{Gl}: 105; v'_{max}: 1,5 ppm/h
der Korrelationskoeffizient der Geraden ab dem 6-Stunden-Wert war: r = 0,94

Da sich Perchloräthylen einerseits im Organismus sehr stark anreichert, andererseits die Metabolisierungsgeschwindigkeit sehr klein ist, konnte die Maximalgeschwindigkeit nicht genau ermittelt werden. Aus dem gleichen Grund war es auch nicht möglich, einen Sättigungspunkt zu messen.

3.1.1.10. Methylchloroform (Vergleichssubstanz)

Methylchloroform: MG : 133,42
Dichte: 1,349
Kp : 74-76°C
F : -32°C
angenehm ätherisch riechende, farblose Flüssigkeit, unlöslich in Wasser, löslich in den üblichen org. Lösungsmitteln, nicht entflammbar, wird durch Licht, Luft, Wärme und Feuchtigkeit zersetzt, deshalb technisch durch Dioxan stabilisiert.

Das vor Versuchsbeginn frisch destillierte 1,1,1-Trichloräthan (Methylchloroform) wurde als Gas-Luftgemisch nach 2.4.3. in das System injiziert. Die gaschromatographische Analyse geschah bei 230°C Säulentemperatur mit einer Retentionszeit von 3,2 min.

Methylchloroform ist nach Weisburger (1977) bei der Ratte

nicht kanzerogen. Da die Substanz sich nur durch das Fehlen der Doppelbindung von den chlorierten Äthylenen unterscheidet, wurde sie in die vorliegenden Untersuchungen mit einbezogen.

Abb. 24 zeigt die Abnahme der Konzentration von dampfförmigem Methylchloroform in der Gasphase bei Exposition von 3 Wistar-Ratten, deren Metabolismus nicht gehemmt worden war.

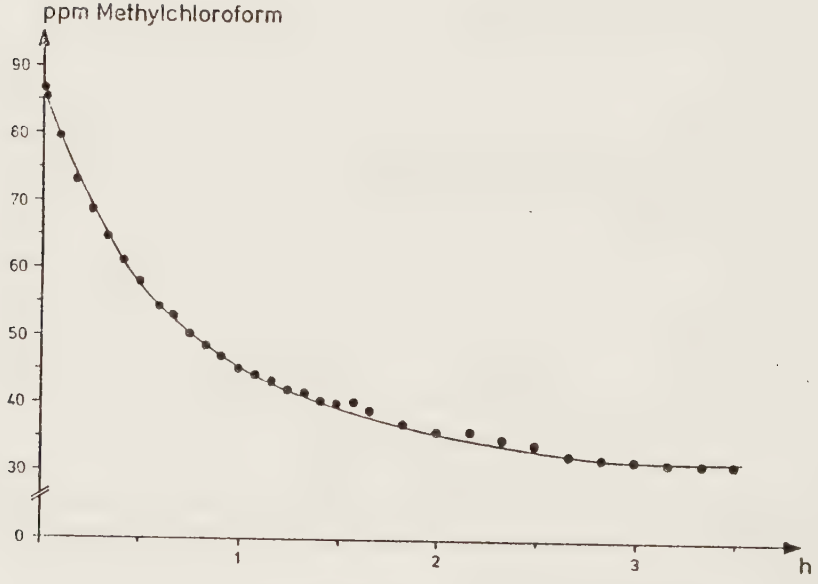


Abb. 24: Konzentrationsabnahme von dampfförmigem Methylchloroform in der Gasphase des Expositionssystems bei Exposition von 3 Wistar-Ratten

Die Versuchsbedingungen waren:

$C_{L(O)}$ 87 ppm; V_L 9720 ml; V_T 580 ml; G_T 580 g;
Anzahl der Tiere: 3 männl. Wistar-Ratten

In dem Versuch wurden bestimmt:

K_{Gl}: 27,5; k: 1,41 h^{-1}; r der Aufnahmekurve: 0,99

Eine signifikante Abnahme der Methylchloroform-Dampfkonzentration nach Einstellung des Verteilungsgleichgewichts konnte nicht festgestellt werden.

3.1.1.11. Tetrachlorkohlenstoff (Vergleichssubstanz)

Tetrachlorkohlenstoff: MG : 153,82
Dichte: 1,594
Kp : 76,7°C
F : -23°C
farblose, nicht brennbare, süßlich riechende Flüssigkeit, in Wasser nur sehr wenig löslich, leicht löslich in org. Lösungsmitteln

Tetrachlorkohlenstoff wurde als Gas-Luftgemisch in das Expositionssystem gegeben, wie unter 2.4.3. beschrieben. Die gaschromatographische Analyse wurde bei 200°C Säulentemperatur mit einer Retentionszeit von 5,8 min durchgeführt.

Der Stoffwechsel der halogenierten Äthylene verläuft über ein Epoxid als Zwischenprodukt (Jaeger et al., 1974; Van Duuren, 1975; Greim et al., 1975; Bonse et al., 1975; Hefner et al., 1975; Kappus et al., 1975; Bonse und Henschler, 1976; Bolt et al., 1976 c; Uehleke et al., 1977).

Der initiale Metabolismus von Tetrachlorkohlenstoff jedoch geschieht durch die Bildung eines Trichlorkohlenstoffradikals, welches durch Cytochrom-P-450-abhängige Enzyme erzeugt wird (Fowler, 1969; Bini et al., 1970; Diaz-Gomez et al., 1973; Uehleke et al., 1973 a; Castro et al., 1973).

Es wurde untersucht, ob sich Tetrachlorkohlenstoff in Bezug auf die Aufnahme in den Organismus, die Hemmbarkeit seines Metabolismus und die irreversible Bindung von Metaboliten an Protein von den halogenierten Äthylenen unterscheidet.

In Abb. 25 ist die Abnahme der Konzentration von dampfförmigem Tetrachlorkohlenstoff im Expositionssystem dargestellt in einem Versuch mit 3 Wistar-Ratten, die mit 200 mg/kg Dithiocarb vorbehandelt worden waren, um den oxydativen Fremdstoffmetabolismus zu hemmen, wie unter 2.3.1. beschrieben.

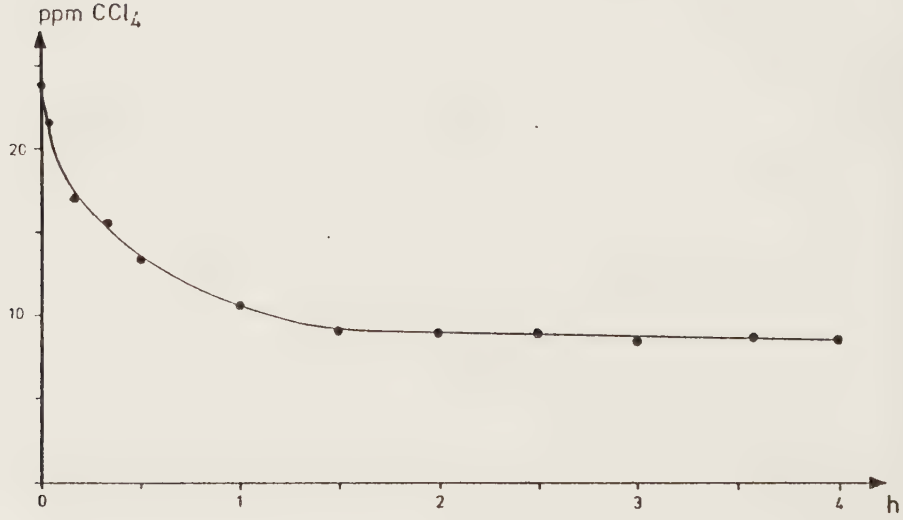


Abb. 25: Abnahme der Konzentration von Tetrachlorkohlenstoffdampf im Expositionssystem bei Exposition von 3 Wistar-Ratten, denen 15 min vor Versuchsbeginn 200 mg/kg Dithiocarb i.p. appliziert worden war

Die Versuchsbedingungen waren:

$C_{L(0)}$ 24 ppm; V_L 9490 ml; V_T 810 ml; G_T 810 g;
Anzahl der Tiere: 3 männl. Wistar-Ratten

Durch den Versuch wurden bestimmt:

K_{Gl}: 20; k: 3 h^{-1}; r der Aufnahmekurve: 0,99

Einen weiteren Versuch mit ebenfalls 3 Wistar-Ratten, der es ermöglichte, das Verteilungsgleichgewicht von Tetrachlorkohlenstoffdampf zwischen der Atmosphäre und dem Organismus und die Clearance bei niedriger Dampfkonzentration dieser Substanz zu bestimmen, zeigt Abb. 26. Für diesen Versuch waren keine metabolischen Inhibitoren appliziert worden.

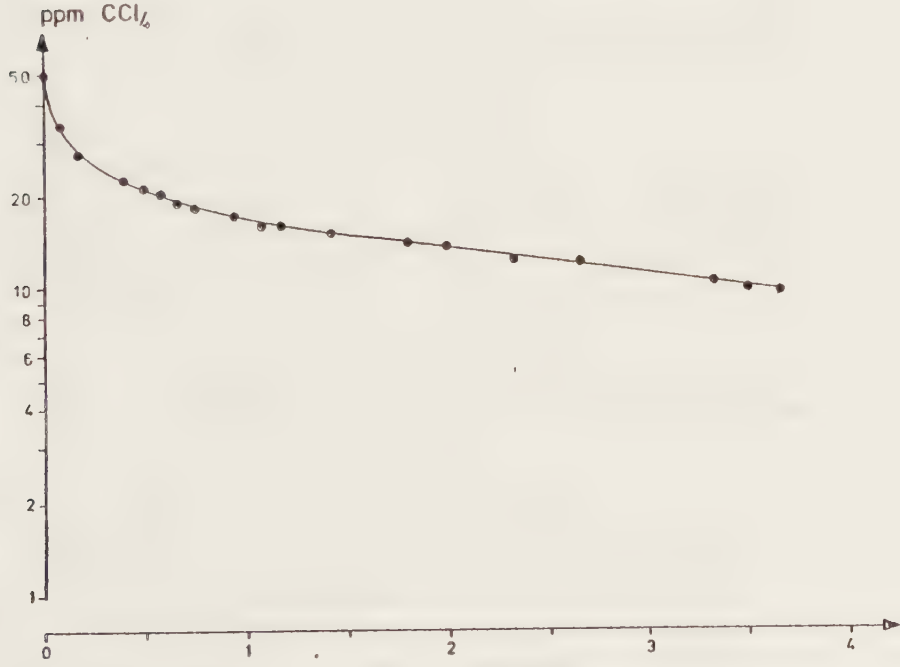


Abb. 26: Konzentrationsabnahme von dampfförmigem Tetrachlorkohlenstoff in der Gasphase des Expositionssystems bei Exposition von 3 Wistar-Ratten

Die Versuchsbedingungen waren:

$C_{L(O)}$ 50 ppm; V_L 9625 ml; V_T 675 ml; G_T 675 g
Anzahl der Tiere: 3 männl. Wistar-Ratten

Durch den Versuch wurden bestimmt:

K_{Gl}: 20,5; k': 0,258 h^{-1}; r der e-Funktion: 0,996

3.1.1.12. Reproduzierbarkeit der Messungen

Von allen untersuchten halogenierten Kohlenwasserstoffen wurden gaschromatographische Eichkurven angefertigt. In dem Konzentrationsbereich, in dem die Versuche stattfanden, waren die Gas- bzw. Dampfmengen dem jeweiligen Elektrometersignal des Schreibers direkt proportional. Mit jeder einzelnen Substanz wurden Vorversuche mit dem leeren Expositionssystem (ohne Tiere) vorgenommen.

Vinylidenfluorid, trans-Dichloräthylen und Perchloräthylen wurden von den Ratten nur sehr langsam metabolisiert. Um sicherzugehen, daß die sehr langsame Abnahme dieser Stoffe im Expositionssystem nicht etwa durch Gasverlust aus dem System zustande kam, wurden Kontrollversuche von bis zu 3-tägiger Dauer durchgeführt. In keinem Fall konnte ein Entweichen der Gase festgestellt werden.

Bei der Dosierung der Gase in das Expositionssystem ergaben sich maximale Schwankungen von ± 10 %.

Wegen der starken Anreicherung von trans-Dichloräthylen, Tetrachlorkohlenstoff und Perchloräthylen im Gewebe und der sehr geringen Geschwindigkeiten, mit denen diese Stoffe und auch Vinylidenfluorid metabolisiert werden, waren hier die Messungen der Konzentrationsänderungen in der Gasphase am ungenauesten. Jedoch variierten selbst hier die aus den einzelnen Versuchen ermittelten kinetischen Parameter um höchstens ± 20 %. Bei den anderen Versuchen war die Genauigkeit der Bestimmungen >10 %. Jeder Versuch wurde mindestens einmal wiederholt.

3.1.2.1. Gleichgewichtseinstellung zwischen Gasraum und Organismus

Wie in 2.9.1. hergeleitet und durch die Versuche (3.1.1.1. bis 3.1.1.11.) gezeigt wurde, ließen sich für jede der untersuchten Substanzen das Verteilungsgleichgewicht K_{Gl} und die Geschwindigkeitskonstante k ermitteln.

Es gilt:

$k = k_{12} + k_{21}$ (Gleichung 15 in 2.9.1.)

und

$K_{Gl} = k_{12} \cdot V_L/(k_{21} \cdot V_T)$ (Gleichung 16 in 2.9.1.1.).

So konnten für die verschiedenen Verbindungen die "Clearance-Werte" für die Partialprozesse, $k_{12} \cdot V_L$ und $k_{21} \cdot V_T$, berechnet werden (siehe Abb. 9, Seite 36). Führt man den Oberflächenfaktor Ø ein, so lassen sich diese Werte auch darstellen als:

$k_{12} \cdot V_L = a \cdot Ø$ (Gleichung 4 in 2.9.1.)

bzw.

$k_{21} \cdot V_T = b \cdot Ø$ (Gleichung 6 in 2.9.1.)

In Tabelle 1 sind die für die verschiedenen Verbindungen bestimmten kinetischen Parameter K_{Gl}, $a \cdot Ø$ und $b \cdot Ø$ zusammengefaßt.

Tabelle 1: Kinetische Parameter der Aufnahme von halogenierten Kohlenwasserstoffen in den Organismus von Ratten bis zur Gleichgewichtseinstellung mit der umgebenden Atmosphäre

Verbindung	K_{Gl}	$a \cdot Ø$ [ml/h]	$b \cdot Ø$ [ml/h]
VF_2	0,23	5 000	21 200
VF	0,91	4 200	4 600
VCl	5,3	34 700	6 600
VBr	11,3	61 500	5 400
VCl_2	7,8	11 600	1 500
trans-DCE	11,5	11 300	985
cis-DCE	20	14 500	730
Tri	52	13 000	250
Per	105	7 200	68

In den durchgeführten Experimenten war es möglich, K_{Gl}, $a \cdot \emptyset$ und $b \cdot \emptyset$ zu bestimmen durch die Messung der Abnahme der Gas- bzw. Dampfkonzentration. Mit Hilfe dieser Parameter lassen sich auch Aussagen machen für den Fall, daß die Anfangskonzentration im System konstant bleibt, was gleichbedeutend mit einem unendlich großen Luftvolumen ist. Es gilt nämlich nach den Gleichungen 4, 6 und 13 in 2.9.1.:

$$(1) \qquad C_{T(t)} = C_{L(0)} \cdot \frac{a}{a \cdot V_T/V_L + b} \left[1 - e^{-(a/V_L + b/V_T) \cdot \emptyset \cdot t}\right]$$

Für $V_L \to \infty$ wird:

$$(2) \qquad C_{T(t)id} = C_{L(0)} \cdot \frac{a}{b} \left[1 - e^{-(b/V_T) \cdot \emptyset \cdot t}\right]$$

$C_{T(t)id}$ ist die zur Zeit t sich im Tier befindende Gaskonzentration, falls die Anfangskonzentration im Gasraum konstant bleibt.

Nach Gleichung 16 in 2.9.1.1. ist $a/b = K_{Gl}$ und nach Gleichung 6 in 2.9.1. ist $b \cdot \emptyset/V_T = k_{21}$. In Gleichung (2) eingesetzt, ergibt sich:

$$(3) \qquad C_{T(t)id} = C_{L(0)} \cdot K_{Gl}\left[1 - e^{-k_{21} \cdot t}\right]$$

Um nun noch die Aufnahme eines Gases auf ein beliebiges Tiervolumen V_x zu beziehen, muß nach Gleichung 6 in 2.9.1. der für k_{21} berechnete Wert mit V_T multipliziert und durch V_x dividiert werden, entsprechend: $b \cdot \emptyset/V_x = k_{21} \cdot V_T/V_x$. So wird aus (3):

$$(4) \qquad C_{xT(t)id} = C_{L(0)} \cdot K_{Gl}\left[1 - e^{-k_{21} \cdot (V_T/V_x) \cdot t}\right]$$

bzw.

$$C_{xT(t)id} = C_{L(0)} \cdot K_{Gl}\left[1 - e^{-b \cdot \emptyset \cdot (1/V_x) \cdot t}\right]$$

$C_{xT(t)id}$ ist die zur Zeit t sich in einem Tier vom Volumen

V_x befindende Gaskonzentration, bei konstanter Konzentration des Gases im Gasraum.

Mit Hilfe dieser Gleichung wurde der zeitliche Verlauf der Gas- bzw. Dampfaufnahme für die verschiedenen untersuchten Kohlenwasserstoffe in 3 Wistar-Ratten von einem theoretischen Körper-Gesamtvolumen V_x = 1000 ml berechnet. Um zu zeigen, wie schnell sich das Verteilungsgleichgewicht bei den einzelnen untersuchten halogenierten Äthylenen zwischen der Atmosphäre und dem Organismus einstellt, wurden die aus Gleichung (4) erhaltenen Konzentrations-Zeit-Kurven in den Abbildungen 27 und 28 dargestellt. Hierzu wurde für jede Substanz eine konstante Konzentration von 100 ppm in der Atmosphäre angenommen. Metabolische Prozesse wurden bei der Darstellung nicht berücksichtigt.

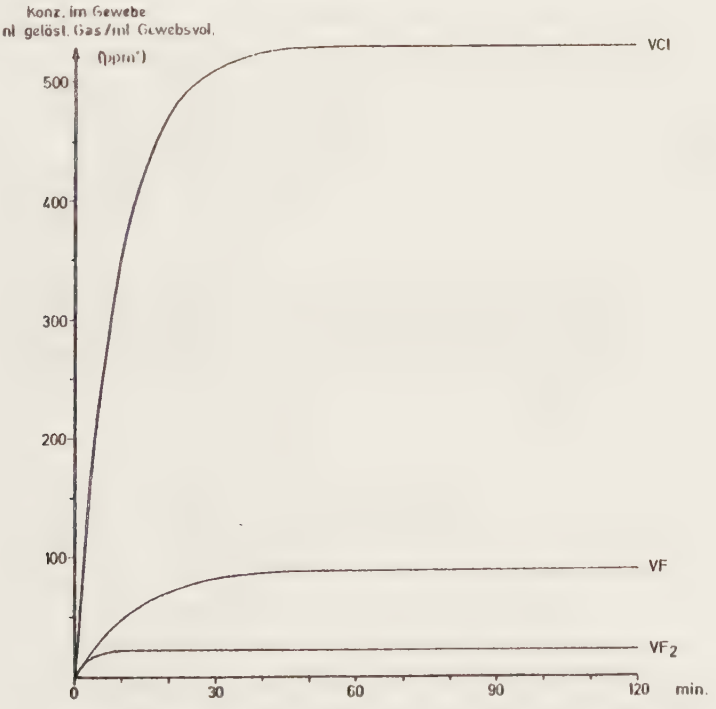


Abb. 27: Aufnahme von halogenierten Äthylenen aus der Atmosphäre in das Gewebe von Ratten. Für jede Substanz wurde eine konstante atmosphärische Konzentration von 100 ppm angenommen. Die Aufnahmekurven wurden auf ein "Tiervolumen" (V_x) von 1000 ml bezogen

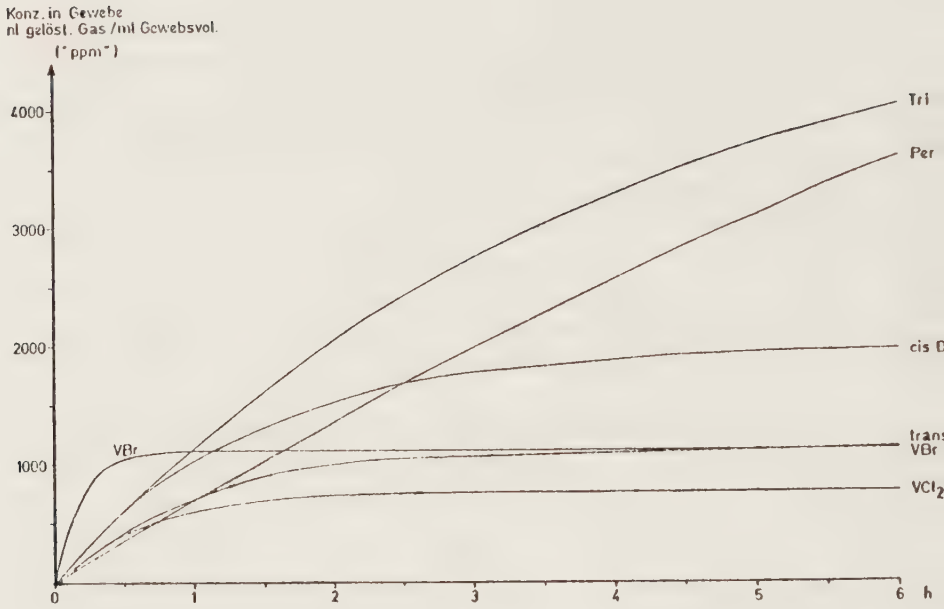


Abb. 28: Aufnahme von halogenierten Äthylenen aus der Atmosphäre in das Gewebe von Ratten. Für jede Substanz wurde eine konstante atmosphärische Konzentration von 100 ppm angenommen. Die Aufnahmekurven wurden auf ein "Tiervolumen" (V_x) von 1000 ml bezogen

Aus den Abbildungen läßt sich erkennen, daß Vinylidenfluorid (VF_2), Vinylfluorid (VF), Vinylchlorid (VCl) und Vinylbromid (VBr) ihr Verteilungsgleichgewicht sehr schnell, nämlich innerhalb von 30 min, erreichen, Vinylidenchlorid (VCl_2), cis-Dichloräthylen (cis-DCE) und trans-Dichloräthylen (trans-DCE) nehmen eine mittlere Stellung ein, während Trichloräthylen (Tri) und Perchloräthylen (Per) ihr Verteilungsgleichgewicht so langsam erreichen, daß sich echte steady-state-Bedingungen innerhalb einer Expositionszeit von 8 h nicht einstellen können.

3.1.2.2. Beziehung zwischen physikalischen Eigenschaften und den Verteilungsgleichgewichten der untersuchten Kohlenwasserstoffe

Das Verhalten der flüchtigen Verbindungen während der Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes zwischen Gasraum und Organismus wird weithin bestimmt durch die Verteilungskonstante K_{Gl} (Gleichung 16 in 2.9.1.1.). Diese wiederum hängt von den physikalischen Eigenschaften der in Frage kommenden Verbindung ab. In Abb. 29 ist die Beziehung zwischen der Flüchtigkeit der einzelnen Substanzen - ausgedrückt als deren Siedepunkte bei 760 torr (K) - und den jeweiligen Verteilungskonstanten (K_{Gl}) dargestellt.

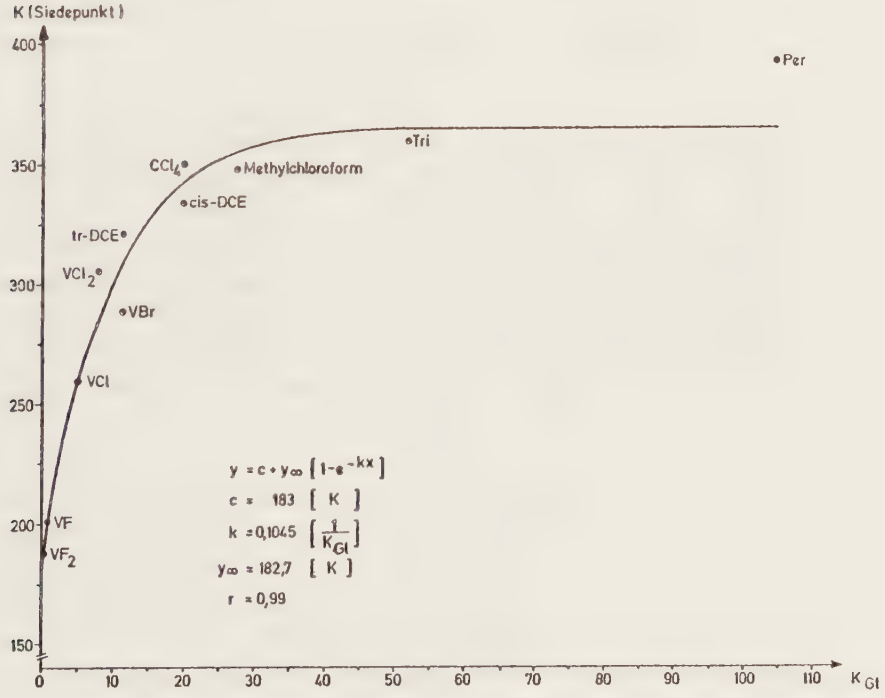


Abb. 29: Beziehung zwischen den Siedepunkten halogenierter Kohlenwasserstoffe und ihren Verteilungskonstanten. (K) Siedepunkt in Kelvin; (K_{Gl}) Verteilungskonstante

Wie sich erkennen läßt, kann man die für die einzelnen Substanzen ermittelten Wertepaare durch eine Kurve der Funktion

$$(5) \qquad y = c + y_{\infty}[1 - e^{-kx}]$$

verbinden, für die ein Korrelationskoeffizient von r = 0,99 errechnet wurde. Auch Methylchloroform und Tetrachlorkohlenstoff verhalten sich in Bezug auf ihre Verteilung zwischen Gasraum und Organismus gleich wie die halogenierten Äthylene.

3.1.3. Metabolische Elimination der halogenierten Äthylene

Aus den Versuchen (3.1.1.1. - 3.1.1.9.) ließen sich die metabolischen Parameter für die halogenierten Äthylene, wie unter 2.9.2. hergeleitet, berechnen. Die ermittelten Werte sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. In dieser Tabelle sind in der letzten Spalte die Sättigungskonzentrationen im Gewebe (Sp_G) aufgeführt. Diese (mit der Dimension nmol pro ml Gewebsvolumen) ergeben sich durch Umrechnen der entsprechenden Sättigungskonzentrationen im Luftraum (Sp), die in ppm angegeben sind, in nmol/ml und Multiplikation mit der Verteilungskonstanten K_{Gl}.

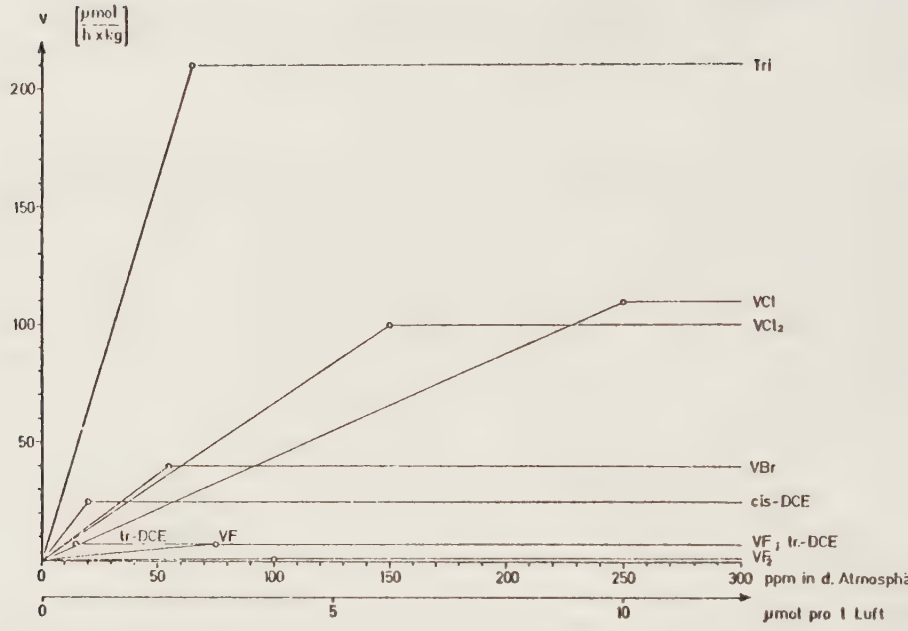
Die metabolischen Parameter aus Tabelle 2 wurden dazu verwendet, die Geschwindigkeiten der metabolischen Eliminierung gegen die Konzentration in der Atmosphäre aufzutragen (Abb. 30a). Hierbei muß berücksichtigt werden, daß die aufgeführten Daten nur gelten, wenn das Gleichgewicht zwischen Gasphase und Organismus schon erreicht ist. Alle in Abb. 30a aufgeführten Verbindungen unterscheiden sich charakteristisch sowohl im Bereich der Kinetik erster Ordnung als auch in ihren Sättigungskonzentrationen und den jeweiligen maximalen Geschwindigkeiten der metabolischen Eliminierung.

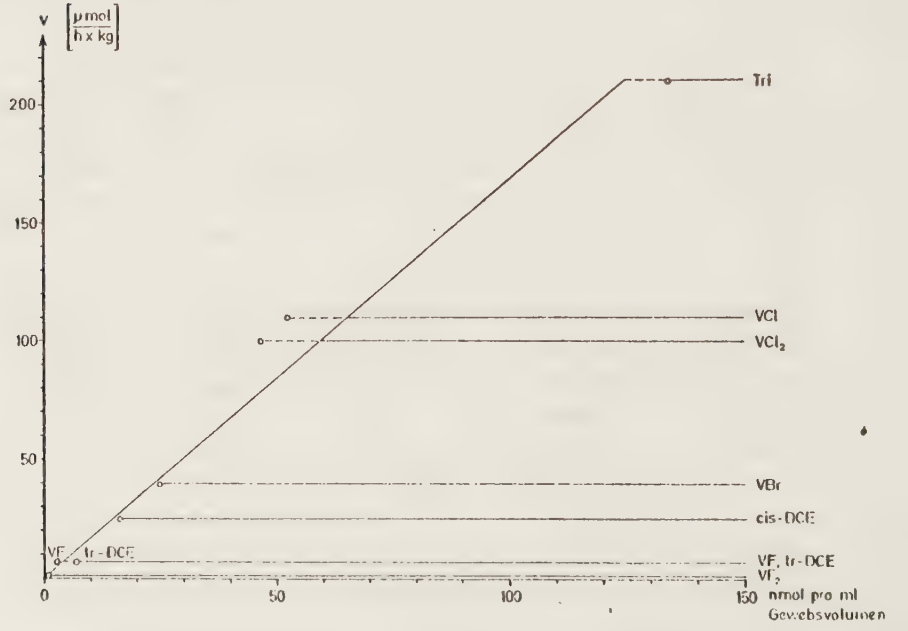
Tabelle 2: Aus Versuchen mit Wistar-Ratten berechnete Parameter des Metabolismus von halogenierten Äthylenen

Verbindung	v_{max} $\left[\frac{\mu mol}{h \cdot kg}\right]$	Sp [ppm]	Cl $\left[\frac{ml}{h \cdot kg}\right]$	Sp_G $\left[\frac{nmol}{ml\ Gewebsvol.}\right]$
VF_2	1,1	100	$0,29 \cdot 10^3$	0,9
VF	7	75	$2,5 \cdot 10^3$	2,7
VCl	110	250	$11 \cdot 10^3$	53
VBr	40	55	$18 \cdot 10^3$	25
VCl_2	100	150	$17 \cdot 10^3$	47
trans-DCE	7	15	$11 \cdot 10^3$	6,8
cis-DCE	25	20	$30 \cdot 10^3$	16
Tri	210	65	$77 \cdot 10^3$	135
Per	< 7	-	-	-

Es ergibt sich jedoch ein völlig anderes Bild, wenn man die metabolischen Eliminierungsgeschwindigkeiten gegen die jeweiligen Konzentrationen im Gewebe der Tiere aufträgt (Abb. 30b): Unterhalb ihrer Sättigungskonzentrationen werden alle Substanzen bei gleicher Konzentration im Gewebe ungefähr gleich schnell metabolisiert. Die Gerade, die die einzelnen Sättigungspunkte miteinander verbindet, hat einen Korrelationskoeffizienten von r = 0,987. Für ihre Steigung errechnet sich pro kg Körpergewicht eine Clearance von 1600 ml (Gewebsvolumen) pro Stunde.

Die einzelnen untersuchten Verbindungen unterscheiden sich auffällig voneinander in ihren maximalen metabolischen Eliminierungsgeschwindigkeiten (v_{max}) im Bereich der Elimination nullter Ordnung.


v [µmol / h x kg]
200
150
100
50
Tri
VCl
VCl2
VBr
cis-DCE
tr-DCE
VF
VF1 tr-DCE
VF2
0
50
100
150
200
250
300 ppm in d. Atmosphäre
0
5
10
µmol pro l Luft


v [µmol / h x kg]
200
150
100
50
Tri
VCl
VCl2
VBr
cis-DCE
VF
tr-DCE
VF1 tr-DCE
VF2
0
50
100
150
nmol pro ml
Gewebsvolumen

3.1.3.1. Entwicklung des Vinylchlorid-metabolisierenden Systems bei der neugeborenen Ratte

In toxikologischen Langzeitexperimenten fand Maltoni (1977), daß neugeborene Ratten bei Exposition gegenüber Vinylchlorid mehr hepatocelluläre Karzinome entwickelten als Tiere, die zu Beginn des Experimentes bereits älter waren. Hieraus ergab sich die Frage, ob sich eventuell kurz nach der Geburt die Leberenzyme entwickeln, die in der Lage sind, Vinylchlorid zu den postulierten reaktiven Zwischenprodukten zu metabolisieren. Um die Geschwindigkeiten der metabolischen Eliminierung von Vinylchlorid in Abhängigkeit vom Lebensalter der Tiere zu bestimmen, wurden verschiedene Würfe von Ratten (jeweils 10-12 Tiere) sofort nach ihrer Geburt und auch an darauffolgenden Tagen in dem unter 2.3.2. beschriebenen Expositionssystem zwischen 2 und 4 h gegenüber verschiedenen Vinylchloridkonzentrationen exponiert und die Abnahme der Gaskonzentration im System gemessen. Die Berechnung der kinetischen Parameter des Metabolismus geschah wie in 2.9.2. hergeleitet. Sie sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

In Abb. 31 sind die Geschwindigkeiten der metabolischen Eliminierung von Vinylchlorid, wie sie sich aus Tab. 3 für die einzelnen Versuche ergeben, gegen die Konzentrationsbereiche von Vinylchloridgas aufgetragen, innerhalb derer die jeweiligen Messungen stattfanden.

Abb. 30: a: Geschwindigkeiten der metabolischen Eliminierung von halogenierten Äthylenen durch Wistar-Ratten in Abhängigkeit von ihrer Konzentration in der Atmosphäre
b: Geschwindigkeiten der metabolischen Eliminierung von halogenierten Äthylenen durch Wistar-Ratten in Abhängigkeit von ihrer Konzentration im Gewebe der Tiere

Tabelle 3: Veränderung der kinetischen Parameter des Stoffwechsels von Vinylchlorid in Abhängigkeit vom Alter von Wistar-Ratten

Wurf Nr.	Alter (Tage)	$v_{max}\left[\frac{\mu mol}{h \cdot kg}\right]$	Sp[ppm]	$Cl\left[\frac{ml}{h \cdot kg}\right]$
1	unmittelbar n. Geburt	5 ± 3	-	-
1	1	18	45	7500
2	1	-	-	8600
3	1	13	30	-
2	2	50	120	9800
3	2	-	-	9200
1	3	65	150	10000
3	3	-	-	11700
3	4	62	150	9000
3	8	90	210	11500
-	erwachsene Ratten	110	250	11000

Man erkennt, daß Wistar-Ratten schon am ersten Tag nach ihrer Geburt Vinylchlorid metabolisieren können. Die maximale metabolische Eliminierung (v_{max}) wird täglich größer und erreicht nach 8 Tagen 80 % des v_{max}-Wertes von ausgewachsenen Tieren. Auffällig ist weiterhin, daß keine Michaelis-Menten-Kinetik vorliegt, denn die Eliminierungsgeschwindigkeiten gehen unvermittelt von einer Kinetik erster Ordnung in eine Kinetik nullter Ordnung über. Außerdem unterscheiden sich die Clearance-Werte (Kinetik erster Ordnung) selbst bei ganz unterschiedlichen v_{max} (Kinetik nullter Ordnung) nicht erheblich. Im Bereich der Kinetik erster Ordnung ist also ein Partialprozeß geschwindigkeitsbestimmend, der von der Enzymaktivität unabhängig ist.

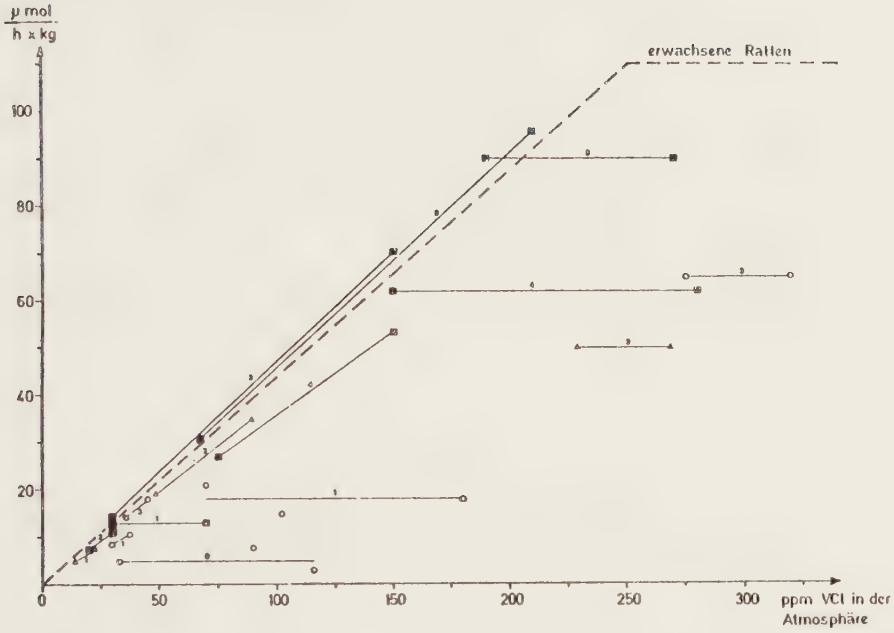


Abb. 31: Geschwindigkeiten der metabolischen Eliminierung von Vinylchlorid aus der Atmosphäre durch Wistar-Ratten, in Abhängigkeit von der Gaskonzentration und dem Alter der Tiere.
Die Ziffern 0-8 stellen das Alter der Tiere in Tagen dar; die verschiedenen Symbole sind stellvertretend für die Würfe Nr. 1-3. Die gestrichelte Linie zeigt die Metabolismusraten, die für erwachsene Ratten ermittelt wurden.

3.1.4. Ausscheidung radioaktiver Metabolite von Vinylchlorid, Trichloräthylen, Vinylbromid und Tetrachlorkohlenstoff im Urin der Ratte

Die Bestimmung der radioaktiven Metabolite von VBr, Tri und CCl_4 im Urin wurde wie unter 2.7.1. beschrieben durchgeführt. Als Bezugswert (100 %) wurde die Menge an Radioaktivität gewählt, die während der Expositionszeit von einem Tier verstoffwechselt wurde. Sie ließ sich auf Grund folgender Überlegungen berechnen:

Falls kein Metabolismus stattfinden würde, müßte die Gesamtmenge im Expositionssystem konstant bleiben. Das heißt:

$$(1) \qquad C^+_{L(0)} \cdot V_L = C^+_{L(Gl)} \cdot V_i = C^+_{L(t>Gl)} \cdot V_i$$

C^+_L sind die Konzentrationen im Luftraum, gemessen in dpm/ml Luft zu den Zeiten t = 0, t = der Zeitpunkt des eingestellten Verteilungsgleichgewichtes und t = ein Zeitpunkt, später als der Zeitpunkt der Gleichgewichtseinstellung. t = Gl ist dann erreicht, wenn die Phase A (siehe Abb. 8, Seite 34) beendet ist. Findet ein Metabolismus statt, dann folgt auf die Phase A die Phase B oder C, je nachdem ob $C^+_{L(Gl)}$ ober- oder unterhalb des Sättigungspunktes liegt. Durch Extrapolation dieser Phase B bzw. C auf den Zeitpunkt t = 0 ergibt sich - direkt ablesbar auf der y-Achse - $C^+_{L(Gl)}$.

Wenn die Substanz metabolisiert wird, dann ist $C^+_{L(Gl)} \neq C^+_{L(t>Gl)}$, und die Differenz der beiden Konzentrationen, multipliziert mit V_i, ergibt die Radioaktivitätsmenge, die bis zu der Zeit t = t>Gl metabolisiert wurde ($RM_{(t>Gl)}$):

$$(2) \qquad (C^+_{L(Gl)} - C^+_{L(t>Gl)}) \cdot V_i = RM_{(t>Gl)}$$

Die auf diese Art errechnete RM zu Expositionsende wurde durch die Anzahl der exponierten Tiere dividiert und die erhaltene Zahl als 100 %-Wert bestimmt.

In ihren Untersuchungen zur Kinetik von radioaktiv markier-

tem 1,2-^{14}C Vinylchlorid bei Wistar-Ratten fanden Bolt und Mitarbeiter (1977 a), daß die Hauptmenge der Metaboliten schon nach kurzer Zeit mit dem Urin ausgeschieden wurde (Abb. 32).

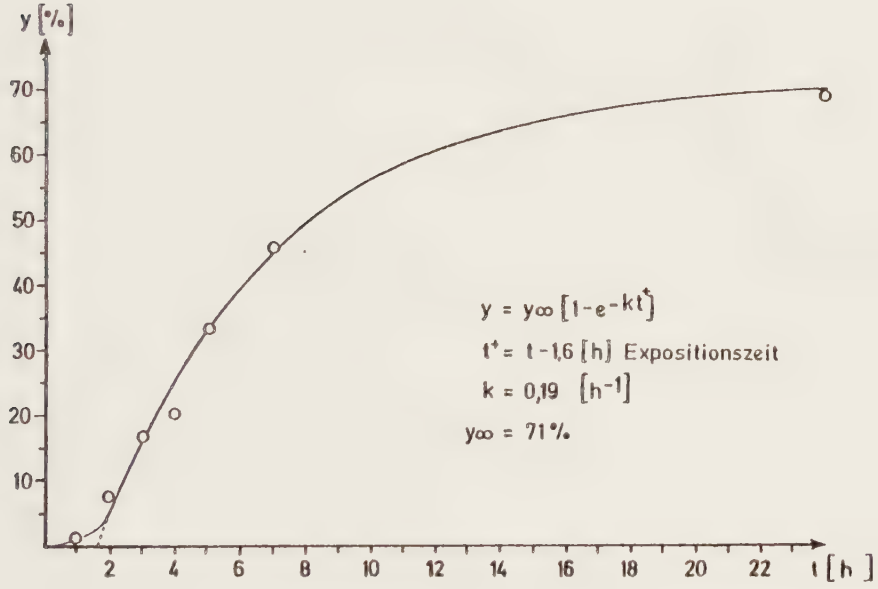


Abb. 32: Kinetik der Urinausscheidung von Metaboliten von C-14-markiertem Vinylchlorid durch 3 Ratten. Die Anfangskonzentration im Expositionssystem war 50 ppm; die Versuchsdauer betrug 1 h. Die während dieser Zeit metabolisierte Radioaktivitätsmenge wurde als 100 %-Wert genommen (aus Bolt et al., 1977 a)

Bei den hier vorliegenden Untersuchungen zur Kinetik der Ausscheidung von Metaboliten des Trichloräthylen und Vinylbromid im Urin von Wistar-Ratten fanden wir recht ähnliche

Ergebnisse (Abb. 33 und 34):

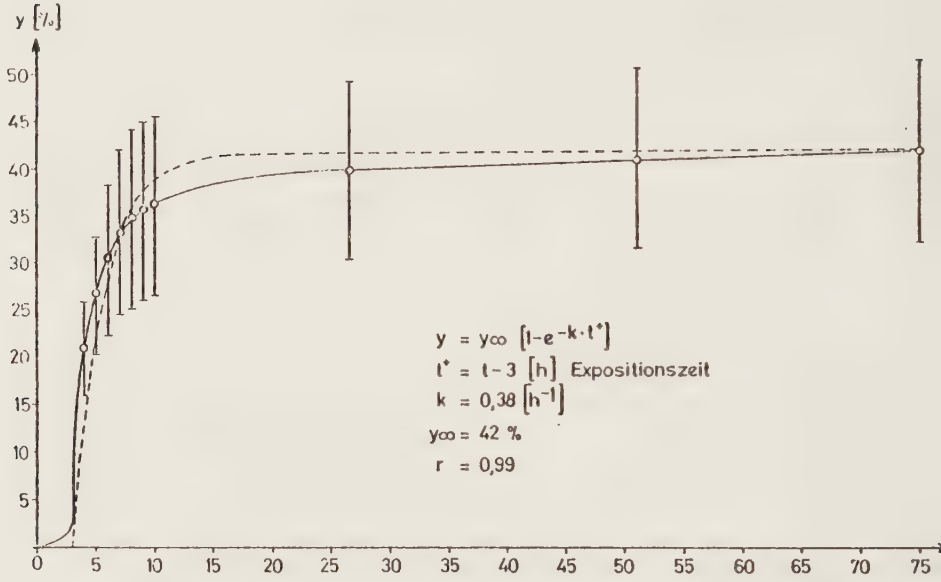


Abb. 33: Kinetik der Urinausscheidung von Metaboliten von ^{14}C-Trichloräthylen durch 3 Ratten. Die Anfangskonzentration im Expositionssystem betrug 280 ppm, entsprechend einer Konzentration von 70 ppm nach der Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes; der Versuch dauerte 3 h. Die während dieser Zeit metabolisierte Radioaktivitätsmenge wurde als 100 %-Wert genommen. Die gestrichelte Kurve stellt die der gemessenen Kurve angepaßte e-Funktion dar

Auch hier ließen sich die Exkretionskurven durch e-Funktionen beschreiben (Korrelationskoeffizienten r >0,99). Die Eliminations-Halbwerts-Zeiten betrugen 1 h 50 min für Trichloräthylen- und 2 h 30 min für Vinylbromidmetaboliten. Für die Ausscheidung von Vinylchloridmetaboliten war eine

Halbwertszeit von 3 h 40 min gefunden worden. Während hier jedoch die Gesamtmenge an Stoffwechselprodukten auf 71 % der metabolisierten Menge anstieg, erreichte sie bei Trichloräthylen bzw. Vinylbromid nur 42 %.

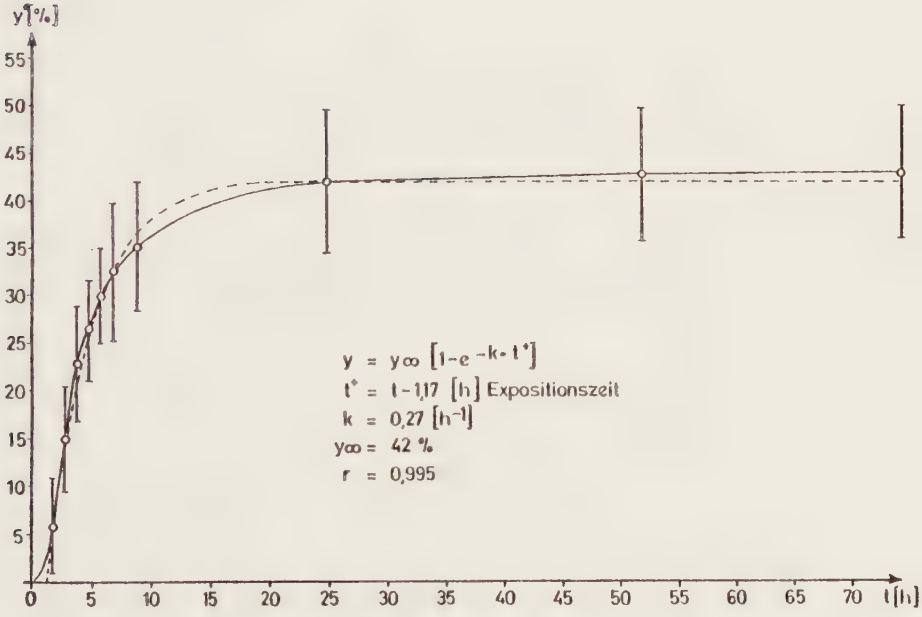


Abb. 34: Kinetik der Urinausscheidung von Metaboliten von ^{14}C-Vinylbromid durch 3 Ratten. Die Anfangskonzentration im Expositionssystem betrug 21 ppm, entsprechend einer Konzentration von 12 ppm unter Berücksichtigung der Gleichgewichtseinstellung; der Versuch dauerte 1 h 10 min. Die während dieser Zeit metabolisierte Radioaktivitätsmenge wurde als 100 %-Wert gewählt. Die gestrichelte Kurve stellt die der gemessenen Kurve angepaßte e-Funktion dar

Die Ausscheidung von radioaktiven Metaboliten von ^{14}C-Tetrachlorkohlenstoff, deren Bestimmung auf die gleiche Art geschah wie bei den untersuchten halogenierten Äthylenen, zeigt eine völlig andere Kinetik (Abb. 35):

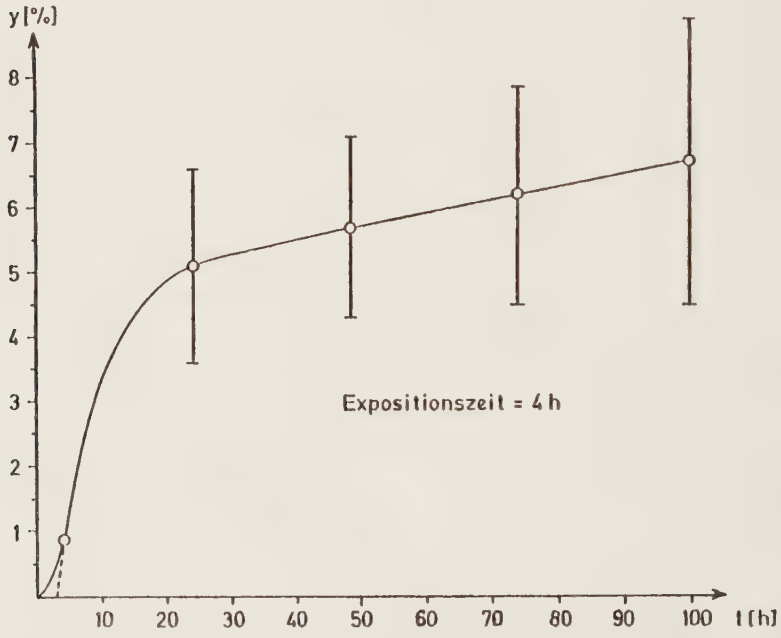


Abb. 35: Kinetik der Urinausscheidung von Metaboliten von ^{14}C-Tetrachlorkohlenstoff durch 3 Ratten. Die Anfangskonzentration im Expositionssystem betrug 3,6 ppm, entsprechend einer Konzentration von 1,6 ppm unter Berücksichtigung der Gleichgewichtseinstellung; der Versuch dauerte 4 h. Die während dieser Zeit metabolisierte Radioaktivitätsmenge wurde als 100 %-Wert gewählt

Am auffälligsten ist, daß sich hier keine e-Funktion anpassen läßt. Eine solche Kinetik deutet auf verschiedene, mengenmäßig in der gleichen Größenordnung vorliegende Metaboliten hin, die sich jedoch in den Halbwertszeiten ihrer Ex-

kretion durch den Urin außerordentlich unterscheiden. So ergibt sich eine durchschnittliche Halbwertszeit von 10 h (abzüglich der Verzögerungs-Phase), was über 2,5 mal länger ist als bei Vinylchlorid. Schließlich ist zu sehen, daß die Summe der im Urin ausgeschiedenen Metaboliten sehr viel geringer ist als die der untersuchten Äthylene. Sie erreichte im Laufe von 100 h nach Exposition der Tiere maximal 10 % der metabolisierten Menge an Tetrachlorkohlenstoff.

3.1.5. Hemmung des Metabolismus halogenierter Kohlenwasserstoffe durch Inhibitoren der mikrosomalen mischfunktionellen Oxidase

Bolt et al. (1976 a) gelang es mit Hilfe von sehr wirksamen Inhibitoren des mikrosomalen oxidativen Fremdstoffmetabolismus, den Stoffwechsel von Vinylchlorid bei der Ratte völlig zu hemmen. Diese Substanzen waren Imidazol- und Benzothiadiazolderivate, die von Wilkinson und Mitarbeitern als Insektizidsynergisten synthetisiert worden waren (Wilkinson, 1971; Wilkinson und Brattsten, 1972; Marshall und Wilkinson, 1973; Wilkinson et al., 1974; Gil und Wilkinson, 1976).

Um die Kinetik der Verteilung von halogenierten Äthylenen aus der Gasphase mit dem Organismus genau messen zu können, erwies es sich als günstig, den Metabolismus zu hemmen (siehe 2.9.1.). Dies gelang unter Verwendung von 6-Chlor-1,2,3-benzothiadiazol bzw. 5-Chlor-1,2,3-benzothiadiazol, wie unter 2.3.1. beschrieben. Da diese Insektizidsynergisten jedoch eine Reihe unerwünschter pharmakologischer Eigeneffekte haben, suchten wir nach weiteren wirksamen Hemmstoffen der mikrosomalen mischfunktionellen Oxidase.

Dithiocarb (Diäthyldithiocarbamat) ist in erster Linie als Antidot bei Schwermetallvergiftungen bekannt (Sunderman,

1967). Aber schon Sakaguchi et al. (1966) wie auch Lange und Jung (1971) berichteten, daß Dithiocarb die Leber von Ratten und Mäusen gegen Vergiftungen durch Tetrachlorkohlenstoff schützte. Siegers und Strubelt (1975) sowie Siegers et al. (1976) postulierten, daß das Prinzip der Schutzwirkung von Dithiocarb gegen durch Tetrachlorkohlenstoff induzierte Leberschädigungen auf einer Hemmung der mikrosomalen mischfunktionellen Oxidase beruhe. Deshalb führten wir zuerst die unter 2.8.3.5. beschriebenen in-vitro-Versuche mit Lebermikrosomen durch, in denen wir die Alkylierung von mikrosomalem Protein durch Metabolite von ^{14}C-Tetrachlorkohlenstoff bestimmten. Dabei zeigte sich, daß Dithiocarb die nur in Gegenwart des NADPH regenerierenden Systems vorkommende Bindung von radioaktivem Material an mikrosomales Protein unterdrückte. Die Ergebnisse dieser Befunde sind unter 3.3.2. aufgeführt.

In-vivo-Versuche in den unter 2.3.2. beschriebenen Expositionssystemen mit Wistar-Ratten und mit Mäusen zeigten ebenfalls, daß sich der Metabolismus von Tetrachlorkohlenstoff hemmen ließ, wenn die Tiere - wie unter 2.3.1. beschrieben - mit Dithiocarb vorbehandelt worden waren. In Abb. 36 wird die Metabolismusgeschwindigkeit von Tetrachlorkohlenstoff bei Wistar-Ratten bei ungehemmtem Stoffwechsel und nach Hemmung durch Dithiocarb dargestellt.

Aus der Steigung der Geraden in Abb. 36 läßt sich für Wistar-Ratten eine Clearance pro kg-Körpergewicht von 7500 ml/h errechnen. Bei entsprechenden Versuchen mit Mäusen fanden wir eine deutlich größere Metabolisierungsrate für Tetrachlorkohlenstoff, nämlich eine Clearance von 12500 ml/h pro kg Körpergewicht.

Da es (Abb. 36) auch in vivo mit Hilfe von Dithiocarb gelang, den Metabolismus von Tetrachlorkohlenstoff praktisch vollständig zu hemmen, lag es nahe, diese Wirkung auch bei halogenierten Äthylenen zu untersuchen. Abb. 10 c zeigt die Abnahme der Konzentration von Vinylidenfluorid-Gas im Expositionssystem nach Vorbehandlung der Wistar-Ratten mit

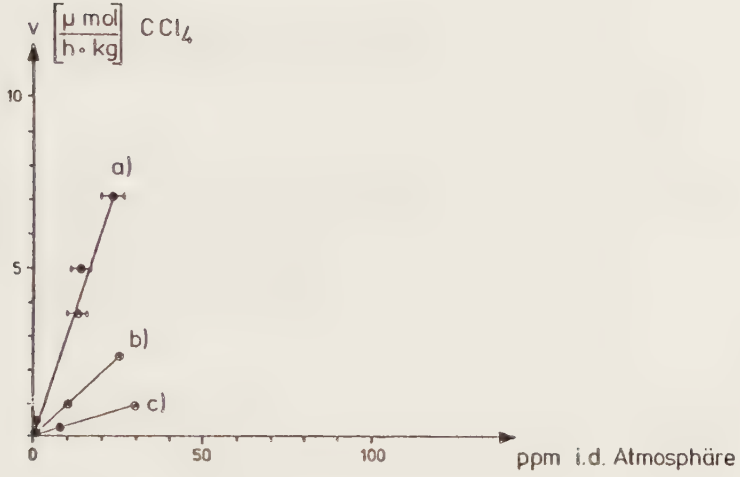


Abb. 36: Geschwindigkeiten der metabolischen Eliminierung von Tetrachlorkohlenstoff bei Wistar-Ratten in Abhängigkeit von seiner Konzentration in der Atmosphäre
a) bei ungehemmtem Metabolismus;
b) und c) bei gehemmtem Metabolismus:
b) nach Vorbehandlung der Tiere mit 100 mg/kg Dithiocarb;
c) nach Vorbehandlung der Tiere mit 200 mg/kg Dithiocarb

100 mg/kg Körpergewicht Dithiocarb.

In Abb. 12 wird die Konzentrationsabnahme von Vinylchlorid-Gas unter den gleichen Versuchsbedingungen dargestellt. Wenn statt Dithiocarb Disulfiram (= Tetraäthylthiuramdisulfid) den Tieren appliziert (siehe 2.3.1.) und anschließend die Konzentrationsabnahme von Vinylchlorid im Exposi-

tionssystem gemessen wurde, so zeigte sich der gleiche Hemmeffekt wie nach Dithiocarb. Dies ist dadurch zu erklären, daß Disulfiram im Organismus teilweise in Dithiocarb überführt wird (Cobby et al., 1977).

In Tabelle 4 sind die Hemmeffekte der einzelnen Inhibitoren bei verschiedenen halogenierten Kohlenwasserstoffen zusammengefaßt.

Tabelle 4: Hemmung des Metabolismus von halogenierten Kohlenwasserstoffen durch verschiedene Inhibitoren der mikrosomalen mischfunktionellen Oxidase. Als Bezugswert für den Grad der Hemmung diente die für den jeweiligen Konzentrationsbereich errechnete Geschwindigkeit der metabolischen Eliminierung ohne Inhibitor

Abbildung d. Versuchs	Substanz	Inhibitor	Dosis [mg/kg Körpergew.]	Hemmung [%]
verwendete Tiere: pro Exposition 3 männl. Wistar-Ratten				
10 c	VF_2	Dithiocarb	100	100
12	VCl	Dithiocarb	100	95
-		Disulfiram	100	95
14	VBr	6-Chlor-1,2,3-benzothiadiazol	200	100
16	VCl_2	6-Chlor-1,2,3-benzothiadiazol	200	85
19	cis-DCE	5-Chlor-1,2,3-benzothiadiazol	200	80
21	Tri	6-Chlor-1,2,3-benzothiadiazol	200	100
-	Per	Dithiocarb	200	100
25	CCl_4	Dithiocarb	200	90
		Dithiocarb	100	70
verwendete Tiere: pro Exposition 6 weibliche Mäuse				
	CCl_4	Dithiocarb	100	50
		Dithiocarb	200	70

3.2. Verteilung halogenierter Äthylene und ihrer Metabolite in den Organen der Ratte

3.2.1. Verteilung von nicht mebatolisiertem Vinylchlorid und Vinylbromid

Die Verteilung von nicht metabolisiertem Vinylchlorid in Organen und Geweben der Wistar-Ratte wurde von unserer Arbeitsgruppe früher beschrieben (Buchter et al., 1977).

Die Untersuchung zur Verteilung von Vinylbromid wurde in analoger Weise ausgeführt:
Drei männliche Sprague-Dawley-Ratten à 250 g wurden nach Vorbehandlung mit 6-Chlor-1,2,3-benzothiadiazol (wie unter 2.3.1. beschrieben) in das Expositionssystem (2.3.2.) gebracht. Dann wurde so viel Vinylbromid-Gas injiziert, daß sich eine Anfangskonzentration von 100 ppm einstellte. Gleichzeitig wurde eine Spurendosis 1,2-^{14}C-Vinylbromid zugegeben, so daß eine Anfangsaktivität von ca. 6000 cpm pro ml Luft im System bestimmt werden konnte.

Schon nach 20 min war das Verteilungsgleichgewicht zwischen der Vinylbromidkonzentration in den Tieren und in der Atemluft eingestellt. Nach einer Expositionszeit von 180 min wurden die Ratten durch Dekapitieren getötet. Sofort danach wurden von verschiedenen Geweben (Lunge, Leber, Milz, Niere, Darm, Fett, Muskel) je ein Aliquot (zwischen 0,5 und 2 g) entnommen und in je ein Zentrifugenglas mit 10 ml Toluol-Szintillator gegeben. Jede Probe wurde nun mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Nach Zentrifugation wurde der klare Überstand in Szintillationsgefäße gegeben und die Radioaktivität gezählt. Die Gleichgewichtsquotienten von Vinylbromid zwischen dem jeweiligen Gewebe und der Luft im System errechnete sich dann zu:

$$\frac{\text{dpm Vinylbromid pro g Gewebe}}{\text{dpm Vinylbromid pro ml Luft}}$$

In Tabelle 5 werden die Gleichgewichtsquotienten von Vinylchlorid und Vinylbromid in verschiedenen Geweben der Ratte dargestellt.

Tabelle 5: Gleichgewichtsverteilung von Vinylchlorid und Vinylbromid in Geweben von Ratten, die gegen eine Atmosphäre von radioaktiv markiertem Vinylchlorid bzw. radioaktiv markiertem Vinylbromid exponiert waren. Der Stoffwechsel von Vinylchlorid war durch 6-Nitro-1,2,3-benzothiadiazol blockiert. Der Metabolismus von Vinylbromid war durch 6-Chlor-1,2,3-benzothiadiazol gehemmt. Angegeben ist jeweils der Mittelwert ± Standardabweichung

Gewebe	Gleichgewichtsquotienten (Gewebe / Luft) Vinylchlorid (n=5) (Buchter et al., 1977)	Vinylbromid (n=3)
Lunge	-	1,1 ± 0,2
Darm	-	0,9 ± 0,1
Blut	0,7 ± 0,1	-
Leber	0,6 ± 0,1	0,9 ± 0,2
Milz	0,6 ± 0,1	1,0 ± 0,3
Niere	0,6 ± 0,2	1,1 ± 0,3
Muskel (M.psoas)	0,7 ± 0,1	1,3 ± 0,3
Fettgewebe	8,3 ± 0,2	22,0 ± 0,5

Im Gleichgewicht betragen die Konzentrationen (pro g Feuchtgewicht) an Vinylchlorid in den untersuchten Organen 60 bis 70 % der Luftkonzentration des Gases. Nur im Fettgewebe wurde Vinylchlorid in 10-fach höherer Konzentration als im Luftraum gefunden.

Vinylbromid reichert sich im Gleichgewicht in den meisten untersuchten Organen und Geweben auf 90 bis 130 % der Luftkonzentration an. Im Fettgewebe jedoch war die Konzentration 20 mal höher als in der Atmosphäre. Das hier

gefundene Verteilungsverhalten von Vinylbromid im Vergleich zu Vinylchlorid stimmt mit dem Verhältnis der unabhängig hiervon ermittelten Gleichgewichtskonstanten $K_{Gl}VCl = 5,3$ und $K_{Gl}VBr = 11,3$ (vgl. Tab. 1) überein.

3.2.2. Irreversible Proteinbindung von Metaboliten halogenierter Kohlenwasserstoffe in verschiedenen Organen

Es ist bekannt, daß Metabolite von Vinylchlorid (Kappus et al., 1975; Bolt et al., 1976 c; Kappus et al., 1976) und von Trichloräthylen (Bolt et al., 1977 b; Van Duuren und Banerjee, 1976) kovalent an Proteine binden. Eine Proteinalkylierung bewirken auch Metabolite von Tetrachlorkohlenstoff (Uehleke und Werner, 1975; Uehleke et al., 1973 a; Diaz Gomez et al., 1973; Rocchi et al., 1973) und von Halothan (Uehleke et al., 1973 b; Van Dyke und Wood, 1975; Hempel und Remmer, 1975).

Wir verglichen die kovalente Proteinbindung von Metaboliten von Vinylchlorid, Trichloräthylen und Tetrachlorkohlenstoff. Die pro Zeiteinheit metabolisierte Menge der untersuchten Kohlenwasserstoffe ist abhängig von der Konzentration dieser Substanzen (siehe Abb. 30 und Abb. 36). Um zu prüfen, ob das Verhältnis an reaktiven Metaboliten bei der jeweiligen Geschwindigkeit des Gesamtmetabolismus konstant bleibt, nahmen wir Messungen der kovalenten Proteinbindung in verschiedenen Konzentrationsbereichen vor. Als Maß für die gebildete Menge reaktiver Metabolite diente uns die Menge der irreversibel an Protein gebundenen Metabolite. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in den Tabellen 6 bis 8 dargestellt.

Die Tiere wurden - wie unter 2.7.2. beschrieben - gegenüber radioaktiv markiertem Vinylchlorid bzw. Trichloräthylen oder Tetrachlorkohlenstoff exponiert. Nach Versuchsende wurden sie getötet und von einzelnen Organen Proben

entnommen. Schließlich wurde die irreversibel an Protein gebundene Radioaktivität gemessen. Die pro g Organfrischgewicht gebundene Menge an Metaboliten wurde als Prozent der Menge an halogeniertem Kohlenwasserstoff berechnet, die während der Versuchsdauer von einer Ratte metabolisiert worden war. Letztere wurde über die aufgenommene Radioaktivität bestimmt, wie in 3.1.4. beschrieben.

Tabelle 6: Irreversibel an Protein gebundene Metabolite von ^{14}C-Vinylchlorid in verschiedenen Geweben von männlichen Wistar-Ratten

	Konzentrationsbereich (nach Einstellung des Gleichgewichtes bis zum Expositionsende)		
Anzahl d. Tiere	VCl=2-0,1 ppm n=4	VCl=70-4,5 ppm n=4	VCl=770-400 ppm n=3
Gewebe	% Radakt./ g Gw.	% Radakt./ g Gw.	% Radakt./ g Gw.
Leber	0,20 ± 0,03	0,22 ± 0,04	0,37 ± 0,06
Niere	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,013	0,09 ± 0,01
Darm	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,1 ± 0,02
Lunge	0,05 ± 0,003	0,06 ± 0,008	0,07 ± 0,006
Milz	0,04 ± 0,003	0,06 ± 0,002	0,06 ± 0,008
Fettgew.	0,01 ± 0,003	0,01 ± 0,003	0,01 ± 0,004
Muskel (M-psoas)	0,01 ± 0,001	0,01 ± 0,001	0,01 ± 0,002

Die Tabellen 6 bis 8 zeigen, daß das Organ mit der größten kovalenten Proteinbindung die Leber ist. Hier findet in erster Linie der Metabolismus der drei halogenierten Kohlenwasserstoffe statt (Bonse et al., 1975). In dem Organ der Exkretion der Metaboliten, der Niere, findet sich die nächstgrößte Menge an alkyliertem Protein. Dann folgen in abnehmender Reihe der Darm, die Lunge und die Milz. Im Fettgewebe und im Muskel wird die geringste Menge an irreversibel gebundenen Metaboliten gefunden.

Tabelle 7: Irreversibel an Protein gebundene Metabolite von ^{14}C-Trichloräthylen in verschiedenen Geweben von männlichen Wistar-Ratten

	Konzentrationsbereich (nach Einstellung des Gleichgewichtes bis zum Expositionsende)		
Anzahl d. Tiere	Tri=3-0,3 ppm n=3	Tri=25-1 ppm n=3	Tri = 250-40 ppm n = 3
Gewebe	% Radakt./ g Gw.	% Radakt./ g Gw.	% Radakt./ g Gw.
Leber	0,18 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,28 ± 0,02
Niere	0,06 ± 0,005	0,06 ± 0,004	0,05 ± 0,01
Darm	0,03 ± 0,006	0,04 ± 0,004	0,05 ± 0,01
Lunge	0,04 ± 0,001	0,04 ± 0,004	0,04 ± 0,002
Milz	0,03 ± 0,001	0,03 ± 0,002	0,03 ± 0,002
Fettgew.	0,01 ± 0,003	0,01 ± 0,002	0,01 ± 0,002
Muskel (M.psoas)	0,01 ± 0,001	0,01 ± 0,006	0,01 ± 0,002

Tabelle 8: Irreversibel an Protein gebundene Metabolite von ^{14}C-Tetrachlorkohlenstoff in verschiedenen Geweben von männlichen Wistar-Ratten

	Konzentrationsbereich (nach Einstellung des Gleichgewichtes bis zum Expositionsende)	
Anzahl d. Tiere	CCl_4 = 1,5-0,5 ppm n = 4	CCl_4 = 31-17 ppm n = 4
Gewebe	% Radakt./g Gew.	% Radakt./g Gew.
Leber	0,57 ± 0,02	0,59 ± 0,1
Niere	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,02
Darm	0,05 ± 0,004	0,09 ± 0,01
Lunge	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,009
Milz	0,02 ± 0,004	0,04 ± 0,004
Muskel (M.psoas)	0,01 ± 0,001	0,03 ± 0,005

Der Prozentsatz an kovalent gebundenen Metaboliten der 3 Kohlenwasserstoffe blieb bei verschiedenen Anfangskonzentrationen ungefähr gleich. Die Geschwindigkeit der Metabolisierung ist jedoch konzentrationsabhängig. Daraus läßt sich folgern, daß das Verhältnis der Geschwindigkeiten der Bildung der reaktiven Metaboliten zu den jeweiligen Geschwindigkeiten des Gesamtmetabolismus nahezu konstant bleibt. Dies gilt bis in den Bereich maximaler Metabolisierungsgeschwindigkeit hinein.

3.2.3. Irreversible Proteinbindung von Vinylchlorid-Metaboliten in der Leber der Ratte

Ein Teil der beim Stoffwechsel von Vinylchlorid entstehenden Metabolite wird nach Green und Hathway (1975) und Watanabe et al. (1976 a,b,c) durch die Bindung an Glutathion entgiftet. Andererseits wird nach Watanabe et al. (1978) durch Vinylchlorid der hepatische Glutathionspiegel gesenkt.

Über einen Konzentrationsbereich von 770 bis 0,1 ppm fanden wir keine größeren Unterschiede hinsichtlich der Alkylierung von Protein durch Metabolite von Vinylchlorid (vergleiche Tab. 6). Würde sich der Glutathionspiegel in der Leber auf die Konzentration der irreversibel an Protein bindenden reaktiven Metabolite auswirken, so sollte sich eine Senkung des Glutathionspiegels dadurch bemerkbar machen, daß sich ein höherer Prozentsatz an kovalent an Protein gebundenen Metaboliten finden ließe. Um diese Frage zu klären, unternahmen wir folgende Versuche:

In dem unter 2.3.2. beschriebenen geschlossenen Expositionssystem wurden jeweils 6 Wistar-Ratten gegen verschieden hohe Anfangskonzentrationen von radioaktiv markiertem Vinylchlorid exponiert. Drei der Tiere waren unbehandelt, den anderen drei Tieren war vor Versuchsbeginn Maleinsäurediäthylester intraperitoneal injiziert worden, um ihren he-

patischen Glutathionspiegel abzusenken (siehe 2.3.1.).

Nach Versuchsende wurden die Tiere getötet und der Prozentsatz der pro g Organfrischgewicht irreversibel an Protein gebundenen Menge an Metaboliten bestimmt (genaue Versuchsanleitung siehe 2.7.2.). Als 100 %-Wert wurde die Menge an radioaktivem Vinylchlorid gewählt, die während des Versuchs metabolisiert worden war (siehe 3.1.4.).

Bei einer weiteren Tiergruppe wurden vorherige Vinylchlorid-Expositionen durchgeführt:
Wir exponierten jeweils 8 h lang 3 Wistar-Ratten gegenüber Vinylchlorid in Konzentrationen zwischen 500 und 1000 ppm. Dann wurde zusätzlich eine Spurendosis radioaktives Vinylchlorid in das Expositionssystem injiziert und nach weiteren 2 h der Versuch beendet. Die Tiere wurden getötet und die Menge an irreversibel proteingebundenen ^{14}C-Vinylchlorid-Metaboliten wurde wie oben bestimmt.

Tabelle 9: Irreversibel an Leberprotein gebundene Metaboliten von ^{14}C-Vinylchlorid nach Exposition von männlichen Wistar-Ratten, die z.T. zur Depletierung ihres hepatischen Glutathions mit Maleinsäurediäthylester vorbehandelt waren. Als 100 %-Wert wurde die von einem Tier während der Dauer eines Versuches metabolisierte Radioaktivitätsmenge gewählt.

	Konzentrationsbereich (nach Einstellung des Gleichgewichtes bis zu Expositionsende)		
	VCl=5,5-0,5 ppm	VCl=300-5 ppm	10 h Langzeitversuch VCl=1000-500 ppm
Anzahl d. Tiere	3	3	6
	% irreversibel an Protein gebundene Radioaktivität pro g Leberfrischgewicht		
vorbehandelt mit Maleinsäurediäthylester	0,19 ± 0,02	0,19 ± 0,05	-
nicht vorbehandelt	0,19 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,33 ± 0,09

Tabelle 9 zeigt, daß eine Vorbehandlung mit Maleinsäurediäthylester die Menge reaktiver Metabolite, die irreversibel an Leberprotein gebunden wird, nicht verändert.

3.3. Untersuchungen in vitro

3.3.1. Aufnahme und kovalente Proteinbindung von [1,2-^{14}C]-Vinylbromid in Lebermikrosomen

In vivo verläuft die metabolische Eliminierung von Vinylchlorid im v_{max}-Bereich ungefähr 2,5 mal schneller als die von Vinylbromid (Tab. 2). Durch bestimmte Benzothiadiazolderivate kann der Metabolismus von Vinylchlorid vollständig gehemmt werden (Bolt et al., 1976 a). Das gleiche Ergebnis ließ sich auch bei Vinylbromid mit 6-Chlor-1,2,3-benzothiadiazol erzielen (Tab. 4).

Kappus et al. (1976) untersuchten die Aufnahme und den Metabolismus von Vinylchlorid durch Lebermikrosomensuspensionen. Um den Metabolismus von Vinylbromid auch in vitro mit Vinylchlorid vergleichen zu können, wurden entsprechende Untersuchungen mit ^{14}C-Vinylbromid durchgeführt.

3.3.1.1. Aufnahme in die Mikrosomensuspension und irreversible Bindung von Metaboliten an mikrosomales Protein

Die Aufnahme von radioaktivem Vinylbromidgas durch Lebermikrosomensuspensionen (siehe 2.8.3.2.) ist in Abb. 37 a dargestellt. Die Bestimmung der Alkylierung von mikrosomalem Protein durch radioaktive Metabolite von Vinylbromid (2.8.3.3.) wird in Abb. 37 b gezeigt.

Wenn Mikrosomen aus Rattenlebern in Abwesenheit des für

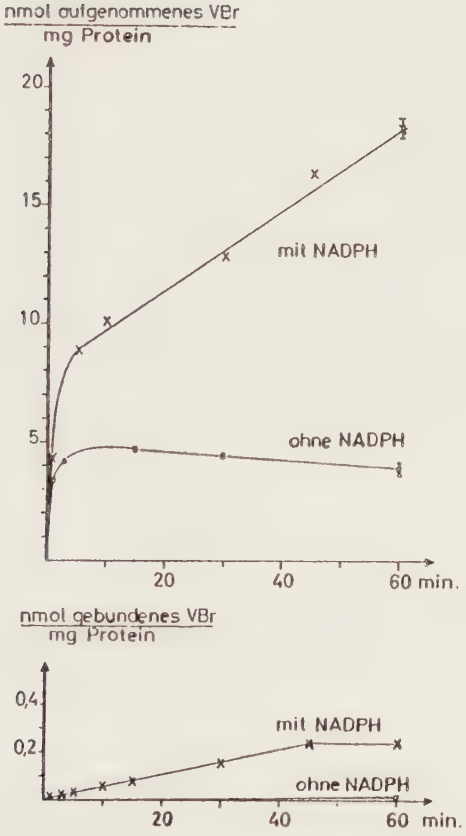


Abb. 37: a) Aufnahme der Radioaktivität von [1,2-^{14}C]-Vinylbromid aus der Gasphase in Mikrosomensuspensionen von Rattenlebern (Sprague-Dawley-Ratten) mit und ohne NADPH-regenerierendes System bei einem Partialdruck von Vinylbromid von 0,25 torr

b) Irreversible Bindung von radioaktiven Metaboliten von Vinylbromid an mikrosomales Protein bei Inkubation von Mikrosomen aus Rattenlebern unter gleichen Bedingungen

den oxidativen Fremdstoffmetabolismus notwendigen Kofaktors NADPH gegenüber gasförmigem ^{14}C-Vinylbromid exponiert wurden, stellte sich das Verteilungsgleichgewicht von Vinylbromid zwischen Gasphase und Mikrosomensuspension nach ca. 5 min ein. In Gegenwart von NADPH jedoch wurde eine weitere Aufnahme von Radioaktivität aus der Gasphase in die Inkubationsansätze beobachtet; das radioaktive Substrat wurde zu nichtflüchtigen Produkten metabolisiert (Abb. 37 a). Wie Abb. 37 b zeigt, bindet ein kleiner Anteil dieser Metabolite irreversibel an mikrosomales Protein.

Abb. 38 zeigt die mikrosomale Aufnahme und die kovalente Bindung von ^{14}C-Vinylbromid an mikrosomales Protein in Abhängigkeit von der Konzentration der Substanz in der Atmosphäre (ausgedrückt als Partialdruck in torr).

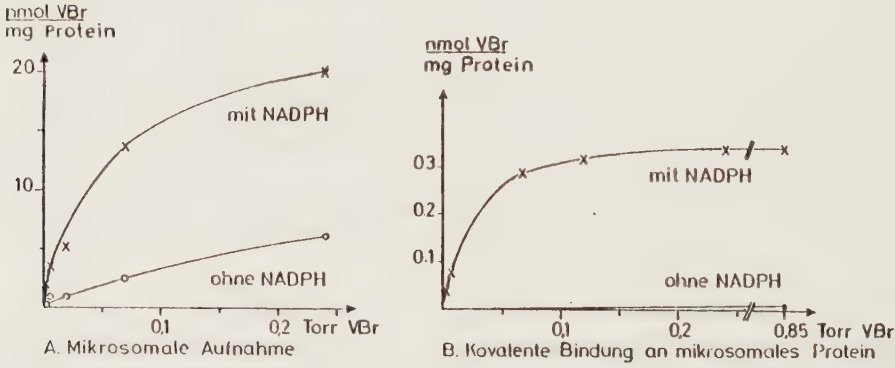


Abb. 38: a) Abhängigkeit der Radioaktivitätsaufnahme von radioaktiv markiertem Vinylbromid in Mikrosomensuspensionen vom Partialdruck des Gases in der Atmosphäre (Versuche mit und ohne NADPH-regenerierendes System)

b) Abhängigkeit der Menge von irreversibel an mikrosomales Protein gebundenen radioaktiven ^{14}C-Vinylbromid-Metaboliten vom Partialdruck

Die Inkubationszeiten betrugen jeweils 60 min. Die Mikrosomen wurden aus Lebern von Sprague-Dawley-Ratten gewonnen.

Betrachtet man die Differenz zwischen der mikrosomalen Aufnahme mit und ohne NADPH in Abb. 38 a als Maß für den mikrosomalen Metabolismus, so zeigt sich eine Sättigung der Vinylbromid metabolisierenden Enzyme oberhalb eines Partialdurckes von 0,15 torr Vinylbromid in der Atmosphäre. Eine Sättigung oberhalb von 0,15 torr ist auch in Abb. 38 b erkennbar, in der die kovalente Proteinbindung durch Metabolite von Vinylbromid in Abhängigkeit vom Partialdruck dargestellt ist. Ohne NADPH findet keine irreversible Bindung von Radioaktivität an mikrosomales Protein statt, während in Gegenwart des NADPH-regenerierenden Systems eine von der Vinylbromidkonzentration abhängige irreversible Bindung von Metaboliten von radioaktiv markiertem Vinylbromid beobachtet wird: Die maximale Geschwindigkeit der Bildung von kovalent bindenden Metaboliten wird unter in-vitro-Bedingungen bei 0,15 torr erreicht und beträgt 0,3 nmol VBr/mg Protein x 60 min.

3.3.1.2. Alkylierung von zugegebenem löslichem Protein durch radioaktive Metaboliten von [1,2-^{14}C]-Vinylbromid

Zur weiteren Untersuchung der irreversiblen Bindung von Metaboliten von Vinylbromid an Proteine wurden einige lösliche Proteine den mikrosomalen Inkubationen zugesetzt und so verfahren, wie unter 2.8.3.4. beschrieben ist.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tab. 10 dargestellt. Die Tabelle zeigt deutliche Unterschiede der Bindung von Metaboliten an die verschiedenen Proteine: Eine vergleichsweise große Menge von Metaboliten bindet an Rinderserumalbumin, weniger an Serumalbumin vom Kaninchen und an Fibrinogen vom Rind. Proteine, die freie SH-Gruppen enthalten, binden mehr Metabolite als solche, die ohne SH-Gruppen sind (z.B. γ-Globulin oder Concanavalin A). Glutathion kann die irreversible Proteinbindung hemmen. Dies stimmt mit der

allgemein vertretenen Annahme überein, daß reaktive Metabolite vorzugsweise an freie SH-Gruppen von Proteinen binden.

Tabelle 10: Irreversible Bindung von Metaboliten von Vinylbromid an lösliche Proteine, die den Inkubationen von Rattenleber-Mikrosomen und einem NADPH-regenerierenden System zugesetzt waren. Der Partialdruck von Vinylbromid in der Gasphase betrug 0,37 torr (Sättigungsbedingungen). Die Prozentangaben beziehen sich auf die an Rinderserumalbumin (BSA) beobachtete Bindung (100 %). Die Bindung an 5 mg BSA betrug 0,19 ± 0,05 nmol des radioaktiven Vinylbromid pro mg mikros. Proteins pro 60 min. Die Angaben sind Durchschnittswerte ± Standardabweichungen aus je 3 Versuchen. Die Mikrosomen wurden von Sprague-Dawley-Ratten isoliert.

Protein (5 mg/ml Inkubationsansatz)	% der Bindung an BSA
Rinderserumalbumin (BSA)	100
BSA + 1 mM Glutathion	14,7 ± 2,2
BSA ohne NADPH reg. System	5,8 ± 0,7
Serumalbumin vom Kaninchen	64,1 ± 16,5
Fibrinogen vom Rind	51,2 ± 17,3
γ-Globulin vom Rind	25,4 ± 10,6
γ-Globulin vom Menschen	32,1 ± 6,7
Concanavalin A	14,5 ± 4,4

3.3.1.3. Hemmung des Metabolismus von Vinylbromid

Den Inkubationsansätzen von Rattenleber-Mikrosomen (siehe 2.8.3.1.) wurden verschiedene Hemmstoffe der mischfunktionellen Oxidase zugesetzt, wie unter 2.8.3.5. beschrieben. Nach jeweils 60-minütiger Exposition gegenüber ^{14}C-Vinylbromid bei Partialdrucken, die zur Sättigung des Metabolismus ausreichten (>0,15 torr), wurde der NADPH-abhängige Anteil der Aufnahme von Radioaktivität (siehe 2.8.3.2.) als

Maßstab für den mikrosomalen Metabolismus von Vinylbromid gewählt. Durch sehr wirksame Inhibitoren läßt er sich vollständig hemmen (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Hemmung des mikrosomalen Metabolismus von ^{14}C-Vinylbromid
Als Maßstab des Metabolismus wurde der NADPH-abhängige Anteil der Aufnahme von radioaktivem Vinylbromid aus der Atmosphäre bestimmt. Die Inkubationszeiten betrugen 60 min. Der Partialdruck von Vinylbromid in der Gasphase war stets >0,15 torr. Die angegebenen Prozentwerte sind aus je 3 Messungen gemittelt. (Zur Aufnahme von Vinylbromid vergleiche die Abb. 37a und 38a). Die Mikrosomen wurden von Sprague-Dawley-Ratten gewonnen

Inhibitor (10^{-4} M)	% Hemmung
(4-Phenyl)-phenyl-4(5)-imidazol	0
Metyrapon	39
1-Naphthyl-4(5)-imidazol	53
5-Nitro-1,2,3-benzothiadiazol	58
6-Äthoxy-1,2,3-benzothiadiazol	67
5,6-Dimethyl-1,2,3-benzothiadiazol	76
6-Methoxy-1,2,3-benzothiadiazol	82
5-Chlor-1,2,3-benzothiadiazol	94
SKF 525 A	97
6-Brom-1,2,3-benzothiadiazol	100
6-Chlor-1,2,3-benzothiadiazol	100

Als Inhibitoren wurden gewählt: Substituierte Imidazole (Wilkinson et al., 1974), Benzothiadiazole (Marshall und Wilkinson, 1973), Metyrapon und SKF 525 A. (4-Phenyl)-phenyl-4(5)-imidazol, welches die mikrosomale Oxidation von Isoproterenol (Scheulen et al., 1977) und von Trichloräthylen (Bolt et al., 1977 b) teilweise inhibiert, hat keinen Effekt auf den Metabolismus von Vinylbromid. Die 1,2,3-

Benzothiadiazole jedoch sind allgemein gute Hemmstoffe des Metabolismus von Vinylbromid.

Unerwartet stark war die Hemmwirkung von SKF 525 A, welches bei dieser Konzentration den mikrosomalen Metabolismus von Trichloräthylen nicht zu hemmen vermag (Bolt et al., 1977 b) und der inhibitorische Effekt von Metyrapon, das die Biotransformation von Vinylchlorid nicht beeinflußt (Bolt et al., 1976 a). Einzelne Inhibitoren können also den mikrosomalen Metabolismus verschiedener halogenierter Äthylene in sehr unterschiedlicher Weise hemmen.

3.3.1.4. Unterschiedliche Metabolisierung von Vinylbromid durch Lebermikrosomen verschiedener Rattenstämme

Bei Untersuchungen zum Stoffwechsel von Vinylchlorid bei der Ratte wurden Unterschiede zwischen einzelnen Tierstämmen vermutet (Bolt et al., 1976 a). Um dies auch für Vinylbromid zu verifizieren, verglichen wir Lebermikrosomen von Wistar-Ratten mit solchen von Sprague-Dawley-Ratten hinsichtlich ihrer Aufnahme und irreversiblen Bindung von Vinylbromid. Tabelle 12 zeigt, daß Mikrosomen von Sprague-Dawley-Ratten Vinylbromid ca. 1,5 mal schneller metabolisieren als Mikrosomen von Wistar-Ratten: Der gleiche Faktor zeigt sich sowohl in der Aufnahme (in Gegenwart von NADPH), als auch in der Bildung von Metaboliten, die kovalent an mikrosomales Protein binden. Außerdem wurde untersucht, ob sich der Metabolismus von Vinylbromid durch Phenobarbitalvorbehandlung steigern läßt. Hierzu wurde der mikrosomale Metabolismus von Vinylbromid von vorbehandelten Sprague-Dawley-Ratten mit dem von unbehandelten verglichen. Wie Tabelle 12 zeigt, stimuliert Phenobarbitalvorbehandlung den mikrosomalen Metabolismus von Vinylbromid.

Tabelle 12 a: Unterschiedliche Metabolisierung von Vinylbromid durch Lebermikrosomen bei verschiedenen Rattenstämmen (Sprague-Dawley und Wistar). Der Partialdruck von ^{14}C-Vinylbromid in der Atmosphäre betrug 0,06 torr. $\bar{x}$ ± S.D.; n = 4.

Aufnahme v. Radioaktivität (nmol/mg Protein x 60 min)		kovalente Proteinbindung (nmol/mg Protein x 60 min)	
mit NADPH	ohne NADPH	mit NADPH	ohne NADPH
Sprague-Dawley		Sprague-Dawley	
14,1 ± 0,35	1,35 ± 0,1	0,26 ± 0,07	0,009 ± 0,002
Wistar		Wistar	
9,7 ± 1,95[a)]	1,35 ± 0,1	0,18 ± 0,06	0,010 ± 0,001

a) 0,01>p>0,005 vs. Sprague-Dawley-Ratten

Tabelle 12 b: Induzierbarkeit des mikrosomalen Metabolismus von Vinylbromid durch Vorbehandlung mit Phenobarbital (PB).
Es wurden Mikrosomen von Sprague-Dawley-Ratten verwendet. Der Partialdruck von Vinylbromid in der Atmosphäre betrug 0,005 torr. $\bar{x}$ ± S.D.; n = 4.

Aufnahme v. Radioaktivität (nmol/mg Protein x 60 min)		kovalente Proteinbindung (nmol/mg Protein x 60 min)
mit NADPH	ohne NADPH	mit NADPH
nicht vorbehandelt		nicht vorbehandelt
0,30 ± 0,03	0,11 ± 0,01	0,0085 ± 0,001
PB-vorbehandelt		PB-vorbehandelt
0,42 ± 0,05[a)]	0,09 ± 0,01	0,013 ± 0,001[b)]

a) 0,01>p>0,005 vs. nicht vorbehandelte Kontrollen

b) p<0,001 vs. nicht vorbehandelte Kontrollen

3.3.2. Hemmung des mikrosomalen Metabolismus von ^{14}C-Tetrachlorkohlenstoff durch Dithiocarb

Mikrosomen aus Rattenlebern bilden aus Tetrachlorkohlenstoff Metabolite, die irreversibel an mikrosomales Protein binden. Verschiedene Autoren (Castro et al., 1973; Diaz Gomez et al., 1973; Uehleke et al., 1973 a) brachten dies in Verbindung mit der hepatotoxischen Wirkung von Tetrachlorkohlenstoff. Nach Fowler (1969), Bini et al. (1970) und den obigen Autoren geschieht der initiale Metabolismus von Tetrachlorkohlenstoff durch die Bildung eines Trichlorkohlenstoffradikals, welches durch Cytochrom-P-450-abhängige mikrosomale Enzyme erzeugt wird. Da nach Siegers und Strubelt (1975) sowie Siegers et al. (1976) Dithiocarb die mikrosomale mischfunktionelle Oxidase der Leber hemmt, führten wir Versuche mit Lebermikrosomen durch, in denen wir die Alkylierung von mikrosomalem Protein durch Metabolite von ^{14}C-Tetrachlorkohlenstoff bestimmten, mit und ohne Zugabe von Dithiocarb und anderen Hemmstoffen.

Hierzu wurden Lebermikrosomen von Wistar-Ratten verwendet, die unter einer ^{14}C-Tetrachlorkohlenstoff-Gas enthaltenden Atmosphäre inkubiert wurden, wie unter 2.8.3.1. beschrieben. Die Alkylierung von mikrosomalem Protein wurde nach 2.8.3.3. bestimmt. Experimente zur Abhängigkeit der irreversibel an mikrosomales Protein bindenden Menge von Metaboliten vom Partialdruck des radioaktiv markierten Kohlenwasserstoffes zeigten, daß die Geschwindigkeit der Metabolisierung von Tetrachlorkohlenstoff zu alkylierenden Produkten schon bei 0,1 torr ihr Maximum erreichte.

Abb. 39 zeigt die Zeitabhängigkeit der irreversiblen Bindung von radioaktiven Metaboliten von Tetrachlorkohlenstoff an mikrosomales Protein bei Inkubation von Lebermikrosomen in einer Atmosphäre, die ^{14}C-Tetrachlorkohlenstoff bei einem Partialdruck von 0,05 torr enthielt. Die Menge an kovalent gebundenem Material nimmt linear mit der Zeit zu und erreicht nach 30-minütiger Inkubationszeit 0,055 nmol CCl_4-Metaboliten pro mg mikrosomales Protein.

Ohne NADPH werden nur Basalwerte gemessen. Auch nach Dithiocarbzugabe in die Inkubationsansätze (1,72 mM) ist die Bindung von radioaktiven Metaboliten an mikrosomales Protein nahezu vollständig gehemmt.

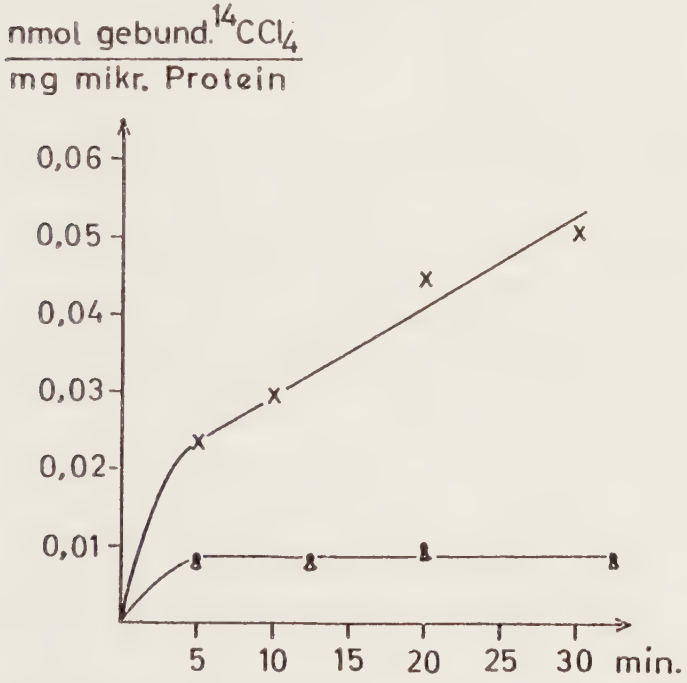


Abb. 39: Zeitverlauf der kovalenten Bindung von radioaktiven Metaboliten von Tetrachlorkohlenstoff an mikrosomales Protein in einer Atmosphäre, die radioaktiven Tetrachlorkohlenstoff von einem Partialdruck von 0,05 torr enthielt.
x-x-x: Inkubationen mit NADPH-regenerierendem System
●-●-●: Inkubationen mit NADPH-regenerierendem System und mit Dithiocarb (1,72 mM)
Δ-Δ-Δ: Inkubationen ohne NADPH

In Abb. 40 sind in einem Dixon-Diagramm die pro mg mikrosomales Protein gebundenen Mengen an radioaktiven Tetrachlorkohlenstoff-Metaboliten gegen die entsprechenden Dithiocarb-Konzentrationen aufgetragen. Es sind Ergebnisse von Versuchen, die sowohl mit Ratten- als auch mit Mäuse-Lebermikrosomen durchgeführt wurden. Die einzelnen Inkubationen fanden unter Substratsättigung statt und dauerten 30 min. Es wurde wie unter 2.8.3.3. beschrieben verfahren.

Aus der Abbildung ist zu sehen, daß zu einer 50-prozentigen Hemmung durch Dithiocarb bei Rattenlebern eine Hemmstoffkonzentration von $2{,}3 \times 10^{-5}$ M ausreicht, während für Mikrosomen aus Mäuseleber für die gleiche Wirkung Dithiocarb in einer Konzentration von 6×10^{-5} M benötigt wird. Dies steht in Einklang mit den Beobachtungen, die wir bei in-vivo-Untersuchungen machten: Die gleiche Dosis Dithiocarb zeigte bei der Maus eine deutlich geringere Hemmung des Metabolismus von Tetrachlorkohlenstoff als bei der Ratte (vgl. Tab. 4).

Die Wirkung vonDithiocarb auf den Metabolismus von Tetrachlorkohlenstoff in Lebermikrosomen wurde mit anderen sehr effizienten Inhibitoren der mischfunktionellen Oxidase verglichen. Hierzu wurden die in Tabelle 13 aufgeführten Hemmstoffe den Inkubationsansätzen mit Mikrosomen aus Rattenlebern zugesetzt, wie unter 2.8.3.5. beschrieben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei einer Atmosphäre, die ^{14}C-Tetrachlorkohlenstoff von einem Partialdruck von 0,05 torr enthielt, wurde die Menge an radioaktivem Material, die irreversibel pro mg mikrosomales Protein gebunden war, nach 2.8.3.3. bestimmt. Als Maßstab für die Hemmversuche diente die bei der ungehemmten, NADPH-abhängigen Inkubation gefundene Alkylierung von mikrosomalem Protein (0,05 nmol gebund. $^{14}CCl_4$/mg mikr. Protein x 30 min = 0 % Hemmung).

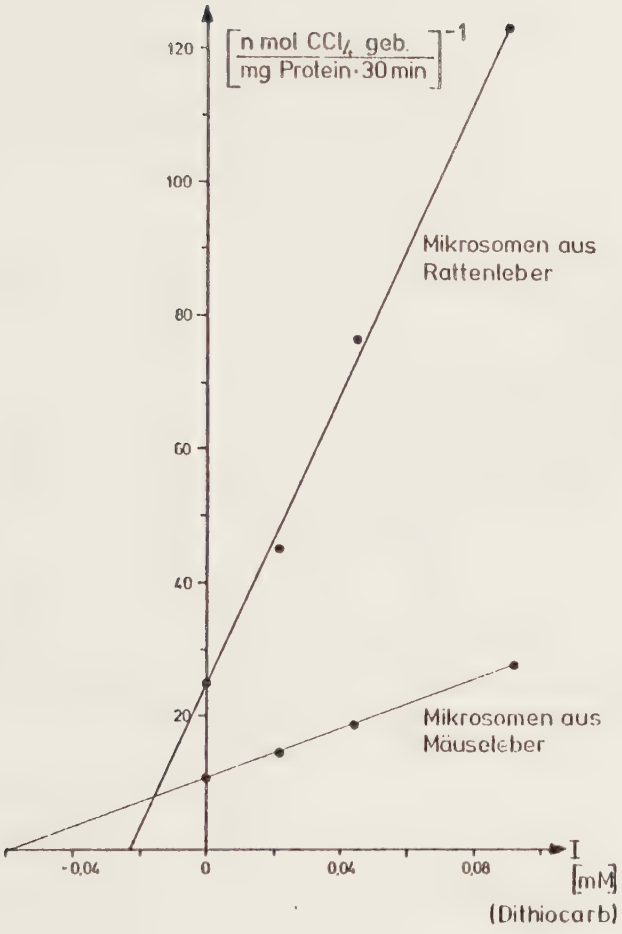


Abb. 40: Durch Dithiocarb bewirkte Inhibierung der kovalenten Bindung von Metaboliten von radioaktivem Tetrachlorkohlenstoff an mikrosomales Protein von Ratten- und Mäuselebern (Dixon-Diagramm). Partialdruck von Tetrachlorkohlenstoff: 0,1 torr; Inkubationszeiten: 30 min

Tabelle 13: Hemmung der durch den mikrosomalen Metabolismus von radioaktivem Tetrachlorkohlenstoff katalysierten Alkylierung von mikrosomalem Protein durch radioaktive Metabolite.
0 % Hemmung entsprechen der Alkylierung, die bei der ungehemmten, NADPH-abhängigen Inkubation gemessen wurde. Die Inkubationszeit betrug 30 min. Der Partialdruck des Tetrachlorkohlenstoffs in der Atmosphäre war 0,05 torr. (Zur Alkylierung von mikrosomalem Protein durch Metabolite von Tetrachlorkohlenstoff vgl. Abb. 37).

Inhibitor (10^{-4} M)	% Hemmung
SKF 525 A	57
6-Brom-1,2,3-benzothiadiazol	57
6-Äthoxy-1,2,3-benzothiadiazol	60
6-Chlor-1,2,3-benzothiadiazol	63
Dithiocarb	98
1-Naphthyl-4(5)-imidazol	100

1-Naphthyl-4(5)-imidazol, ein Inhibitor der mikrosomalen mischfunktionellen Oxidase (Wilkinson et al., 1974), der den mikrosomalen Metabolismus von Trichloräthylen (Bolt et al., 1977 b) und von Vinylbromid (siehe 3.3.1.3.) teilweise hemmt, unterdrückt die Bildung von kovalent an Protein bindenden Metaboliten von Tetrachlorkohlenstoff vollständig. Umgekehrt ist der Einfluß der 1,2,3-Benzothiadiazole: Sie sind gute bis sehr gute Hemmstoffe der Biotransformation von Vinylchlorid (Bolt et al., 1976 a), von Vinylbromid (siehe 3.3.1.3.) und von Trichloräthylen (Bolt et al., 1977 b), erweisen sich jedoch als nur mäßige Inhibitoren der Metabolisierung von Tetrachlorkohlenstoff. Auch SKF 525 A zeigt bei den untersuchten Kohlenwasserstoffen ganz unterschiedliche Effekte: Während es in vivo die Geschwindigkeit der metabolischen Eliminierung von Vinylbromid um 76 % verringert (Bolt et al., 1976 a), vermag es in vitro den mikrosomalen Metabolismus von Trichloräthylen

nicht zu hemmen (Bolt et al., 1977 b). In der gleichen Konzentration hemmt es den mikrosomalen Metabolismus von Vinylbromid nahezu vollständig (siehe Tab. 11), den von Tetrachlorkohlenstoff jedoch nur um 57 %. Die Hemmwirkung von Dithiocarb auf die Bildung von alkylierenden Metaboliten von Tetrachlorkohlenstoff ist in vitro mit der von 1-Naphthyl-4(5)-imidazol vergleichbar. Dithiocarb schützt die Leber auch gegen hepatotoxische Verbindungen wie Paracetamol (Strubelt et al., 1974), Brombenzol, Thioacetamid und Dimethylnitrosamin (Siegers und Strubelt, 1975; Abanobi et al., 1977). Die Toxizität dieser Substanzen beruht auf ihrer Metabolisierung durch die mikrosomale mischfunktionelle Oxidase (Mitchel et al., 1973; Jollow et al., 1974; Hunter et al., 1977; Shank, 1975). Die Schutzwirkung von Dithiocarb scheint auf einer Hemmung der mischfunktionellen Oxidase zu beruhen, worauf auch unsere Untersuchungen zum Stoffwechsel von Tetrachlorkohlenstoff hinweisen. Da Dithiocarb nicht die unerwünschten pharmakologischen Eigenschaften hat, die andere untersuchte Inhibitoren besitzen, erprobten wir seine Hemmwirkung auch auf den Metabolismus einiger halogenierter Äthylene in vivo (siehe 3.1.5.).

Dabei zeigte sich (vgl. Tab. 4), daß schon eine Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht genügte, den Stoffwechsel verschiedener halog. Äthylene bei der Ratte vollständig zu inhibieren.

3.4. Bildung von Aceton bei der Ratte in vivo unter der Einwirkung halogenierter Äthylene

Wir exponierten männliche Wistar-Ratten in dem unter 2.3.2. beschriebenen geschlossenen System gegen verschiedene Konzentrationen von trans-1,2-Dichloräthylen. Bei der gaschromatographischen Analyse der Luftproben bei einer Säulentemperatur von 200°C (siehe 2.5.) entdeckten wir ein zusätzliches Elektrometersignal des Schreibers mit einer kür-

zeren Retentionszeit (2,5 min) als der von trans-1,2-Dichloräthylen (3,0 min), welches in Kontrollexperimenten ohne trans-1,2-Dichloräthylen nicht gefunden wurde. Da die Intensität des Signals im Laufe der Expositionszeit zunahm, führten wir GC/MS-Analysen (siehe 2.6.) durch, um die auftretende Substanz zu identifizieren.

Bei einer Ionisationsenergie von 80 eV und einer Ionenquellentemperatur von 180°C wurde folgendes Massenspektrum gefunden:

m/e-Wert	15	26	27	42	43	58
Relative Intensität	27	5	7	8	100	36

Dies ist ein typisches Acetonspektrum mit den beiden Hauptfragmenten von m/e = 43 und m/e = 58 (Spiteller und Spiteller, 1973; Sharkey et al., 1956).

In einem ersten Experiment wurden 2 Ratten über einen Zeitraum von 26 h in einem geschlossenen System von 5,8 l Volumen (siehe 2.3.2.) einer trans-1,2-Dichloräthylenkonzentration ausgesetzt, die zu Expositionsbeginn 200 ppm betrug. Gleichzeitig wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt mit ebenfalls 2 Wistar-Ratten in einem gleich großen Exsikkator, der an die gleiche Sauerstoffquelle angeschlossen war und sich nur durch das Fehlen des halogenierten Kohlenwasserstoffes unterschied. Abb. 41 zeigt die GC-Massenfragmente, die wir aus 5 ml Luftproben nach 26 h aus dem Expositionsexperiment (I) und aus dem Kontrollexperiment (II) erhielten.

Bei der GC/MS-Messung mit Helium als Trägergas hatte Aceton bei einer Säulentemperatur von 180°C eine Retentionszeit von 2,2 min. Es wurde massenspektrometrisch durch seine beiden charakteristischen Massenfragmente bestimmt. Nach 26-stündiger Versuchsdauer war die Acetonkonzentration im Kontrollexperiment weniger als 5 % der Acetonkonzentration, die bei Exposition gegen trans-1,2-Dichloräthylen entstanden war (Abb. 41). In Abb. 42 wird ein Experiment gezeigt, in dem 2 männliche Wistar-Ratten in einem geschlossenen

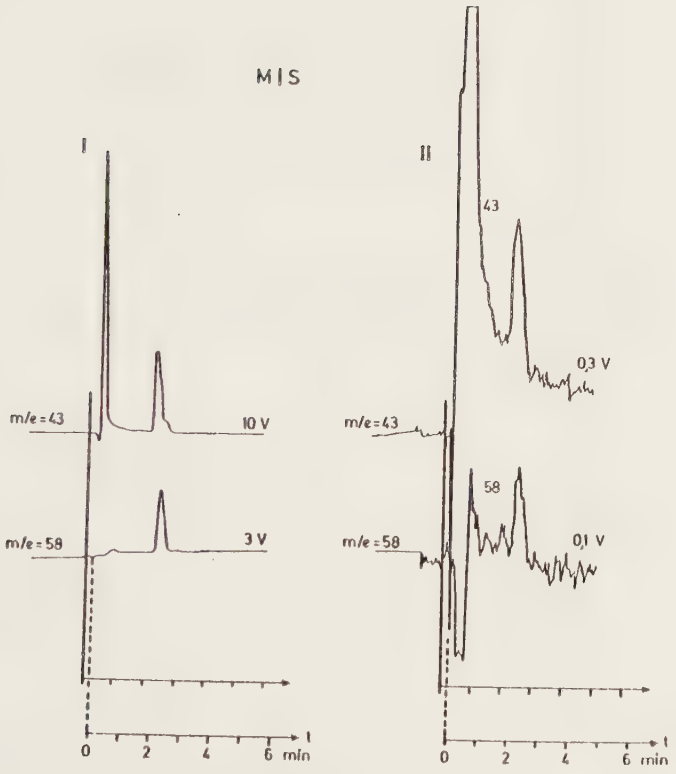


Abb. 41: Massenfragmentogramme der beiden Hauptmassenfragmente von Aceton bei der GC/MS-Messung von 5 ml Luftproben aus einem geschlossenen mit 2 Ratten besetzten System nach 26 h.
(I) Expositionsexperiment mit 200 ppm trans-1,2-Dichloräthylen zu Versuchsbeginn
(II) Gleichzeitig durchgeführtes Kontrollexperiment ohne trans-1,2-Dichloräthylen: nur Spuren von Aceton sind feststellbar
(Die Empfindlichkeit im Kontrollexperiment ist 33 mal größer als im Expositionsexperiment)

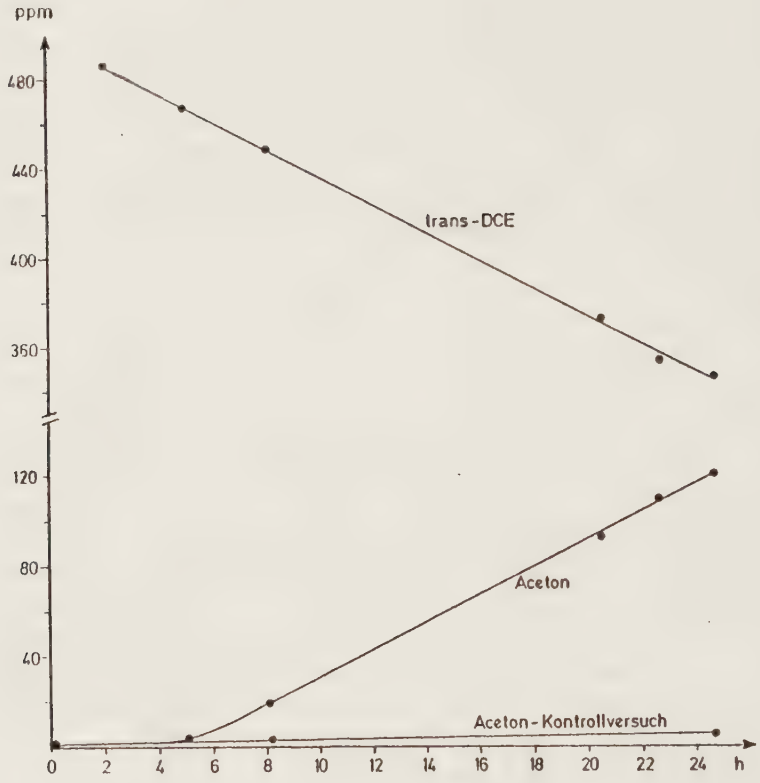


Abb. 42: Konzentrations-Zeit-Diagramme von trans-1,2-Dichloräthylen (trans-DCE) und Aceton in der Gasphase eines mit 2 Ratten besetzten geschlossenen Expositionssystems von einem Gesamtvolumen von 5,8 l. $C_{L(0)}$ von trans-DCE 900 ppm; V_L 5440 ml; V_T 360 ml; G_T 360 g
Auch die Acetonkonzentrationen in einem gleichzeitig durchgeführten Kontrollexperiment (ohne trans-DCE) sind dargestellt

System von 5,8 l Volumen (siehe 2.3.2.) gegen trans-1,2-Dichloräthylen von einer Anfangskonzentration von 900 ppm exponiert waren. Nach einer Verzögerungs-Phase von ungefähr

5 h beginnt die Acetonbildung; danach nimmt die Acetonkonzentration linear mit der Zeit zu.

Die Anfangskonzentration von 900 ppm trans-1,2-Dichloräthylen sinkt innerhalb der ersten 2 h auf ungefähr 500 ppm ab. Diese schnelle Abnahme beruht auf der Verteilung der Substanz zwischen der Gasphase und dem Organismus der Tiere (vgl. Abb. 8: Aufnahmephase A und Abb. 18). Anschließend nimmt die Dampfkonzentration mit konstanter Geschwindigkeit ab, was sich mit einer Sättigung des metabolisierenden Enzymsystems in diesem Konzentrationsbereich erklären läßt (siehe Tab. 2).

Die Acetonmengen, die während der linearen Phase zwischen der 6. und der 25. Stunde der trans-1,2-Dichloräthylenexposition gebildet wurden, betrugen 1,95 ± 0,79 µmol/h pro kg Körpergewicht ($\bar{x}$ ± S.D.; aus 3 Experimenten mit je 2 Ratten).

Einzelne Experimente mit Versuchszeiten zwischen 24 h und 28 h, die mit cis-1,2-Dichloräthylen (Konzentrationsbereich von 1100 ppm bis 60 ppm), Perchloräthylen (Konzentrationsbereich von 2300 ppm bis 100 ppm), Vinylidenfluorid (Konzentrationsbereiche von 500 ppm bis 400 ppm und von 30 ppm bis 10 ppm) und mit Vinylchlorid (Konzentrationsbereich von 1000 ppm bis 500 ppm) durchgeführt wurden, zeigten, daß in allen Fällen nach Anlauf-Phasen von 4 h bis 5 h Aceton in der gleichen Größenordnung gebildet wurde wie bei trans-1,2-Dichloräthylen. Die Geschwindigkeit der Acetonbildung variierte in den einzelnen Untersuchungen zwischen minimal 1,2 und maximal 2,5 µmol Aceton/h pro kg Körpergewicht. Bei allen Versuchen wurden gleichzeitig Kontrollexperimente mit der gleichen Sauerstoffversorgung durchgeführt, jedoch ohne halogeniertes Äthylen. Diese erwiesen sich als nötig, um mit Sicherheit andere Acetonquellen auszuschließen. So fanden wir zum Beispiel in einigen Sauerstoff-Gasflaschen signifikante Mengen Aceton, die sich während des Sauerstoffverbrauchs durch die Tiere im Expositionssystem hätten akkumulieren können.Diese Schwierigkeit

ließ sich durch Zwischenschalten eines Molekülfilters beseitigen. In den Kontrollexperimenten wurden nie mehr als 0,05 µmol Aceton/h pro kg Körpergewicht bestimmt.

4. DISKUSSION

4.1. Pharmakokinetisches Modell

Die hier vorgelegten Befunde zeigen, daß die Sättigbarkeit des Metabolismus, die Gehring und Mitarbeiter (Gehring et al., 1977; Gehring et al., 1978) im Falle des Vinylchlorid und Reichert und Henschler (1978) sowie McKenna et al. (1978) im Falle des Vinylidenchlorid aufgezeigt haben, auch für die übrigen halogenierten Äthylene zutrifft.

In ihrer kürzlich veröffentlichten Analyse des pharmakokinetischen Verhaltens von Vinylchlorid bei der Ratte verwendeten Gehring et al. (1978) das kinetische Modell von Michaelis und Menten, um den Dosis-abhängigen Metabolismus von Vinylchlorid aufzuzeigen. Wie aus den Abbildungen 10, 11, 13, 15, 17, 18, 20 und 22 zu erkennen ist, verhielten sich die von uns gemessenen pharmakokinetischen Kurven jedoch nicht gemäß der Kinetik von Michaelis und Menten, sondern sie zeigten Kinetiken erster respektive nullter Ordnung, wobei der Übergang von der einen in die andere Ordnung in ganz bestimmten, eng begrenzten Konzentrationsbereichen stattfand. Beide kinetischen Ansätze, der von Gehring et al. (1978) verwendete und der unsrige, beschreiben in der Sache das gleiche Verhalten, nämlich Dosisabhängigkeit und Sättigbarkeit des Metabolismus der in Frage kommenden Verbindungen bei in-vivo-Untersuchungen.

Um die Pharmakokinetik der verschiedenen halogenierten Äthylene gleichartig abhandeln zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit das pharmakokinetische Verhalten dieser Stoffe gegliedert in das Verhalten bei der Gleichgewichtseinstellung zwischen Gasphase und Organismus und den metabolischen Partialprozeß. Dies war notwendig, weil das metabolische Verhalten dosisabhängig ist und in jeweils einen Bereich nullter Ordnung bzw. erster Ordnung unterglieder werden mußte.

4.2. Metabolische Aspekte

In ihrem pharmakokinetischen Verhalten unterscheiden sich die halogenierten Äthylene in dreierlei Hinsicht voneinander: Erstens in ihrem Verteilungsverhalten; zweitens in den zur Sättigung ihres Metabolismus nötigen Konzentrationen der jeweiligen Substanzen, und drittens in den für die einzelnen Verbindungen verschiedenen, individuellen Metabolisierungsgeschwindigkeiten.

Das Verteilungsverhalten wird, wie in 3.1.2.2. gezeigt wurde, offensichtlich nur durch die physikalischen Eigenschaften der untersuchten Verbindungen bestimmt.

Es läßt sich nämlich eine durch eine e-Funktion (Gleichung 5 in 3.1.2.2.) darstellbare Beziehung zwischen den Verteilungskonstanten (K_{Gl}) und den Siedepunkten der einzelnen Substanzen finden (siehe Abb. 29). Die Höhe des Siedepunktes ist ein Maß für die Stärke der zwischenmolekularen Wechselwirkungen (Kohäsion). Die "Van der Waals-Kräfte" hängen in erster Linie von der Oberflächengröße der Partikeln und ihrer Polarisierbarkeit ab (Staab, 1966; Christen, 1970). Da alle hier untersuchten Substanzen sehr lipophil und außerordentlich wenig wasserlöslich sind, bedeutet dies, daß sich die verschiedenstarke Anreicherung der einzelnen Verbindungen im Organismus allein aus ihren Kohäsionseigenschaften erklären läßt.

Die metabolischen Parameter hingegen sind durch die Wechselwirkungen zwischen den Verbindungen und den metabolisierenden Enzymen bestimmt. Ein wichtiger Faktor ist die verschiedene Anreicherung der halogenierten Äthylene im Organismus; gleiche atmosphärische Konzentrationen der verschiedenen Substanzen bedingen völlig unterschiedliche Konzentrationen ("Substratkonzentrationen") am metabolisierenden Enzymsystem.

Werden die metabolischen Eliminierungsgeschwindigkeiten der halogenierten Äthylene gegen die jeweiligen Konzentrationen dieser Substanzen im Gewebe der Tiere aufgetragen

(Abb. 30 b), so läßt sich erkennen, daß unterhalb der einzelnen Sättigungskonzentrationen alle Substanzen mit annähernd der gleichen Eliminierungsrate metabolisiert werden. Bei niedrigen Konzentrationen der untersuchten Kohlenwasserstoffe limitiert also ein Prozeß die Metabolisierungsgeschwindigkeiten, der sich durch eine Kinetik erster Ordnung beschreiben läßt und der offensichtlich unabhängig ist von den chemischen Reaktivitäten dieser Verbindungen gegenüber der mikrosomalen mischfunktionellen Oxidase. Ein solcher Partialprozeß kann der Transport an das metabolisierende Enzymsystem sein. Andererseits muß unter v_{max}-Bedingungen die enzymatische Turnover-Rate den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellen (siehe Abb. 30 a bzw. Abb. 30 b). Hier bedingen unterschiedliche Substrateigenschaften der einzelnen Verbindungen gegenüber dem Enzymsystem die verschiedenen v_{max}-Werte (vgl. Tab. 2).

Nach Untersuchungen an der isolierten perfundierten Rattenleber und auf Grund theoretischer Überlegungen stellten Bonse et al. (1975) eine Regel auf, mit der sie das metabolische Verhalten chlorierter Äthylene zu erklären versuchten. Sie zeigten, daß im allgemeinen eine umgekehrte Beziehung zwischen der Anzahl der Chlor-Substituenten und der Metabolisierungsgeschwindigkeit besteht. Die von uns durchgeführten in-vivo-Experimente bestätigen dies insofern, als auch wir eine Abnahme der v_{max}-Werte in der Reihenfolge VCl>VCl_2>cis- und trans-DCE>Per ermitteln konnten (vgl. Tab. 2 und Abb. 30). Trichloräthylen jedoch fällt vollkommen aus dieser Beziehung heraus: Hier bestimmten wir nämlich die größte Geschwindigkeit der metabolischen Eliminierung von allen untersuchten Substanzen. Dieses abnorme Verhalten der mikrosomalen mischfunktionellen Oxidase bei der Metabolisierung von Trichloräthylen fanden wir ebenfalls bei in-vitro-Untersuchungen mit Lebermikrosomen und einem NADPH-regenerierendem System (siehe 4.3.).

Vergleichende weiterführende Untersuchungen, die nicht im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführt wurden (Bolt et al., 1979), zeigten, daß diejenigen halogenierten

Äthylene, die in vivo den geringsten Umsatz hatten (trans-DCE, Per, VF_2), mikrosomale oxidative Reaktionen des Arzneimetabolismus am stärksten zu hemmen vermögen. Dies spricht dafür, daß zwar eine relativ starke Bindung an die umsetzende mikrosomale Monooxigenase stattfindet, daß die Oxidation dieser Stoffe aus enzymologischen Gründen oder Gründen der Reaktivität jedoch nur sehr langsam erfolgt.

In der Einleitung zu dieser Arbeit wurde ausgeführt, daß man toxische Wirkungen der halogenierten Äthylene auf reaktive Metaboliten zurückführt. Deshalb ist die Kenntnis eventueller Speziesunterschiede in der Metabolisierungsrate von großer Wichtigkeit.

Die in dieser Arbeit ermittelten pharmakokinetischen Parameter gelten nur für Wistar-Ratten. Andere Stämme können bereits Unterschiede in der Geschwindigkeit der metabolischen Eliminierung zeigen. So fanden wir bei in-vitro-Untersuchungen (siehe 3.3.1.4., Tab. 12 a), daß Lebermikrosomen von Sprague-Dawley-Ratten Vinylbromid um ungefähr 50 % schneller metabolisieren, als solche von Wistar-Ratten. Auch entdeckten wir bei Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Vinylchlorid Speziesunterschiede. Mäuse und mongolische Rennmäuse ("gerbils") metabolisieren Vinylchlorid schneller als Ratten; der Vinylchloridstoffwechsel ist beim Kaninchen und beim Menschen jedoch wesentlich langsamer als bei der Ratte. Diese Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. A. Buchter (Institut und Poliklinik für Arbeits- und Sozialmedizin der Universität Köln) durchgeführt (Buchter et al., 1978).

Die Richtigkeit der vorliegenden Berechnungen wurde durch jüngst publizierte Daten an der isolierten perfundierten Leber bestätigt (Reichert et al., 1978). Diese Autoren bestimmten die Geschwindigkeit des Metabolismus von Vinylidenchlorid an der isolierten perfundierten Rattenleber. Die gefundene Maximalgeschwindigkeit war 7,64 µmol/3 h · g Lebergewicht. Unter Zugrundlegung eines mittleren Lebergewichtes von etwa 8 g pro 200 g Körpergewicht bei männli-

chen Wistar-Ratten ergibt sich somit aus diesen Daten ein Maximalumsatz von 100 µmol/h · kg Körpergewicht, was mit den von uns errechneten Daten (siehe Tab. 2) übereinstimmt.

Prinzipiell gelten die hier besprochenen Gesetzmäßigkeiten der Pharmakokinetik halogenierter Äthylene auch für die unmittelbar postnatale Phase der Ratte. Aus Abb. 31 geht hervor, daß 80 % der vollen Maximalgeschwindigkeit des Vinylchlorid-Metabolismus bei der Ratte schon 8 Tage nach der Geburt erreicht werden. Unmittelbar nach der Geburt ist die metabolische Kapazität für Vinylchlorid noch sehr gering. Der hauptsächliche Sprung in der Entwicklung des metabolisierenden Enzymsystems tritt um den zweiten bis vierten Lebenstag ein. Durch diese Befunde des Vinylchlorid-Metabolismus bereits bei sehr jungen Ratten wird verständlich, daß eine Vinylchlorid-Exposition von Ratten schon kurz nach der Geburt zu präneoplastischen Veränderungen an der Leberzelle führen kann (Laib et al., 1979).

4.3. Irreversible Bindung von Metaboliten halogenierter Äthylene an makromolekulare Substanzen

Nach Applikation radioaktiv markierter Äthylene konnte hier im Falle des Vinylchlorid und des Trichloräthylen gezeigt werden, daß bei der Ratte in vivo markierte Metabolite irreversibel an Proteine verschiedener Organe gebunden werden (siehe Tab. 6 und Tab. 7). Wie zu erwarten war, wird der größte Teil irreversibel an Protein gebundener Metaboliten in der Leber gefunden.

Über einen sehr großen Konzentrationsbereich, also bei ganz unterschiedlichen Geschwindigkeiten metabolischer Eliminierung, wurde stets das gleiche Verhältnis von kovalent an Leberprotein gebundenem Material zu der insgesamt metabolisierten Menge der jeweiligen Verbindung gefunden. Hieraus folgt zwingend, daß der hepatische Glutathionspiegel die kovalente Bindung von Vinylchlorid- und Trichloräthy-

len-Metaboliten nur sehr wenig beeinflußt. Diese Überlegung wird gestützt durch die Tatsache, daß sich auch nach Vorbehandlung mit Maleinsäurediäthylester keine Veränderung der Bindungsverhältnisse von Vinylchloridmetaboliten feststellen ließ (vgl. Tab. 9).

Kappus et al. (1975) konnten zeigen, daß Rattenlebermikrosomen im Beisein von NADPH Vinylchlorid in einen Metaboliten (wahrscheinlich Chloräthylenoxid) überführen, der irreversibel mit SH-Gruppen von Proteinen reagiert. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß sich Vinylbromid in dieser Hinsicht sehr ähnlich verhält wie Vinylchlorid.

Zwischen den Ergebnissen der pharmakokinetischen Untersuchungen in vivo und den in vitro erhobenen Befunden lassen sich einige wesentliche Parallelen ziehen:

Das unterschiedliche Verteilungsverhalten der halogenierten Äthylene, das sich in der Pharmakokinetik durch die in Abb. 29 dargestellte Beziehung ausdrückt, spielt auch bei Untersuchungen in vitro eine sehr große Rolle, wenn die Stoffe bei mikrosomalen Inkubationen in der Gasphase angeboten werden. Tab. 14 vergleicht die Aufnahme von Vinylchlorid, Vinylbromid und Trichloräthylen aus der Gasphase in die mikrosomale Inkubation und stellt diese den entsprechenden aus den in-vivo-Versuchen abgeleiteten Parametern gegenüber.

Sowohl in Bezug auf das sich einstellende Gleichgewicht als auch auf die Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung findet sich ein gleichsinniges Verhalten in der Reihe der drei untersuchten Äthylene.

Tabelle 15 zeigt die Konzentrationen an Vinylchlorid, Vinylbromid und Trichloräthylen in der Gasphase, die zur Sättigung des Metabolismus in vivo nötig sind, bzw. die zur Sättigung des Metabolismus nötigen Partialdrucke im mikrosomalen Ansatz.

Außerdem werden die maximalen Metabolisierungsgeschwindigkeiten der 3 Verbindungen (in vivo) mit den maximalen Ge-

Tabelle 14: Aufnahme von Vinylchlorid, Vinylbromid und Trichloräthylen aus der Atmosphäre in das Gewebe von Ratten (in vivo) bzw. in Mikrosomensuspensionen aus Rattenlebern (in vitro).
t_1: Zeit bis zur Erreichung von 90 % des Verteilungsgleichgewichtes zwischen Gasphase und Organismus, auf ein Tiervolumen von 1000 ml bezogen (zur Berechnung dieser Werte siehe Gleichung 4 in 3.1.2.1.)
t_2: Zeit bis zur Erreichung des Verteilungsgleichgewichtes zwischen Gasphase und Mikrosomensuspension
Die Verteilung zwischen Gasphase und Mikrosomensuspension ist angegeben als die Konzentration des jeweiligen Äthylens (nmol/mg Protein) nach Erreichung des Gleichgewichtes bei einem Partialdruck von 0,2 torr. Zu den in-vitro-Angaben für Vinylchlorid siehe Kappus et al. (1976), für Trichloräthylen siehe Bolt et al. (1977 b), zu Vinylbromid siehe die Abb. 38 a bzw. 37 a. Die in-vivo-Angaben wurden Tab. 1 entnommen.

	in vivo		in vitro	
	K_{Gl}	t_1[h]	[nmol/mg Protein] (Konz.d.Äthylend. im Gl.bei 0,2 torr)	t_2[min]
VCL	5,3	0,3	2,5	5
VBr	11,3	0,3	5	5
Tri	52	10	65	20

schwindigkeiten der Bildung von kovalent an mikrosomales Protein bindenden Metaboliten (in vitro) verglichen.

Sowohl in vitro als auch in vivo wird die Reihenfolge abnehmender Sättigungskonzentrationen von Vinylchlorid>Trichloräthylen>Vinylbromid ermittelt. Auch bezüglich der Metabolisierungsgeschwindigkeiten lassen sich die in-vivo- mit den in-vitro-Ergebnissen vergleichen: Trichloräthylen wird am schnellsten metabolisiert, dann folgen Vinylchlorid und schließlich Vinylbromid.

Tabelle 15: Sättigungskonzentrationen und maximale Metabolisierungsgeschwindigkeiten von Vinylchlorid, Vinylbromid und Trichloräthylen in vivo bzw. zur Sättigung des Metabolismus nötige Partialdrucke und maximale Geschwindigkeiten der kovalenten Bindung von Metaboliten dieser 3 Substanzen an mikrosomales Protein im mikrosomalen Ansatz. Die in-vitro-Angaben für Vinylchlorid sind entnommen aus Kappus et al. (1976), die für Trichloräthylen aus Bolt et al. (1977 b). Zu Vinylbromid siehe Abb. 38 b. Die in-vivo-Angaben wurden Tab. 2 entnommen.

	in vivo		in vitro	
	Sättigungskonz. [ppm]	$v_{max}\left[\frac{\mu mol}{h \cdot kg}\right]$	Sättigung bei Partialdruck [torr]	Geschw.d. irrevers. Proteinbind. [nmol/mg Prot. · h]
VCl	250	110	1,0	0,5
VBr	55	40	0,15	0,3
Tri	65	210	0,2	1,0

4.4. Bildung von Aceton unter Einwirkung halogenierter Äthylene auf den Organismus der Ratte

Bei Expositionen von Wistar-Ratten gegenüber verschiedenen halogenierten Äthylenen (Vinylidenfluorid, Vinylchlorid, trans- und cis-Dichloräthylen, sowie Perchloräthylen) atmeten die Tiere Aceton mit einer Bildungsgeschwindigkeit von 1,95 ± 0,79 (SD) µmol/h pro kg Körpergewicht ab (siehe 3.4.). Perchloräthylen, trans- und cis-Dichloräthylen werden in der Industrie als Lösungs- und Reinigungsmittel verwendet. Die "MAK-Werte" von Perchloräthylen liegen bei 100 ppm, die der beiden Isomeren bei 200 ppm. Diese Konzentrationen wurden auf Grund früherer Veröffentlichungen über die narkotischen Eigenschaften dieser Verbindungen gewählt (Deutsche Forschungsgemeinschaft, 1974).

Tierexperimente zeigten jedoch, daß bei Expositionen von Ratten gegenüber trans- oder cis-Dichloräthylen in einer Konzentration von 200 ppm der Arzneistoffwechsel durch die mischfunktionelle Oxidase der Leber gehemmt war (Freundt und Macholz, 1978). Außerdem führten unterschiedlich lange Expositionen von Ratten gegenüber 200 ppm trans-Dichloräthylen zur Verfettung bei Hepatozyten und Kupfferzellen (Freundt et al., 1977). Diese Veröffentlichungen richteten das Interesse auf besonders durch trans-Dichloräthylen hervorgerufene hepatische Effekte. In dieser Hinsicht verdient die Entdeckung der Acetonabatmung durch Ratten während der Exposition gegenüber trans-Dichloräthylen und anderen halogenierten Olefinen Beachtung. Es ist außerordentlich unwahrscheinlich, daß Aceton ein Metabolit dieser Verbindung ist, da dies einen Übergang von einem C_2-Fremdstoff zu einem C_3-Körper voraussetzen würde. Außerdem unterscheidet sich der Metabolismus dieser sehr verschiedenen halogenierten Äthylene sowohl qualitativ als auch quantitativ, während die Geschwindigkeit der Acetonbildung bei allen untersuchten Substanzen innerhalb der gleichen Größenordnung lag. Letzteres spricht auch gegen die durch einige halogenierte Äthylene induzierbare Lipidperoxidation als Ursache der Acetonbildung, denn früher durchgeführte in-vitro-Experimente haben gezeigt, daß sich die Lipidperoxidation bei Benutzung verschiedener halogenierter Äthylene als Initiatoren beträchtlich unterscheidet (Köster et al., 1977; Köster et al., 1978). Überhaupt keine Peroxidation konnte durch cis- oder trans-Dichloräthylen induziert werden (Köster et al., 1978).

Es bleibt die Möglichkeit, daß die Abatmung von Aceton auf Änderungen im Lipid- und Fettsäurestoffwechsel hinweist, so wie sie auch bei Hunger oder beim Diabetes mellitus bestehen. Dies würde mit der von Freundt et al. (1977) gegebenen Interpretation der von diesen Autoren beobachteten Leberverfettung bei gegenüber trans-Dichloräthylen exponierten Ratten übereinstimmen; nach diesen Autoren weist die Fettinfiltration der Leber auf einen möglichen metabo-

lischen Defekt hin, der durch "veränderte Enzymaktivitäten in der Leber verursacht sein könnte".

Jaeger und Mitarbeiter haben kürzlich einen neuen Mechanismus diskutiert, um die hepatotoxischen Effekte von Vinylidenchlorid zu erklären (Jaeger, 1977; Jaeger et al., 1977). Nach der Hypothese dieser Autoren könnte Monochloressigsäure als Metabolit von Vinylidenchlorid die Leberzelle durch Hemmen von Enzymen des Zitronensäurezyklus schädigen. Ob sich die metabolischen Effekte anderer halogenierter Äthylene durch ähnliche Mechanismen erklären lassen, bedarf weiterer Untersuchungen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1) Die Pharmakokinetik der halogenierten Äthylene Vinylidenfluorid, Vinylfluorid, Vinylchlorid, Vinylbromid, Vinylidenchlorid, trans- und cis-Dichloräthylen, Trichloräthylen und Perchloräthylen in der Atemluft wurde bei der Ratte vergleichend untersucht. Die Ratten wurden in einem geschlossenen Inhalationssystem gegenüber verschieden hohen Anfangskonzentrationen der halogenierten Äthylene in der Atmosphäre exponiert. Die Konzentrationsabnahme während der Versuchsdauer wurde gaschromatographisch gemessen. Die pharmakokinetische Analyse der gemessenen Kurven ergab folgendes Bild:
Das Verteilungsverhalten der untersuchten Verbindungen zwischen Organismus und Gasphase wird durch physikalische Faktoren (Kohäsionseigenschaften, Van der Waals-Kräfte) bestimmt. Es läßt sich eine Beziehung zwischen den Gleichgewichtskonstanten der einzelnen Verbindungen und deren Flüchtigkeit (Siedepunkt) herstellen. Substanzen mit niederem Siedepunkt werden im Gewebe weniger angereichert als solche mit höherem Siedepunkt und umgekehrt. Verbindungen, die sich im Gewebe stark anreichern (z.B. Trichloräthylen und Perchloräthylen), benötigen wesentlich mehr Zeit zur Gleichgewichtseinstellung als flüchtigere Substanzen.
Da diese Stoffe außerordentlich schlecht wasserlöslich sind, reichern sie sich sehr stark im Fettgewebe (der lipophilen Phase) an. Dieses Verteilungsverhalten konnte am Beispiel von ^{14}C-Vinylchlorid und von ^{14}C-Vinylbromid gezeigt werden.

2) Die metabolische Eliminierung der halogenierten Äthylene ist ein sättigbarer, dosisabhängiger Prozeß. Bei Exposition von Tieren gegenüber einer atmosphärischen Konzentration, die über dem Sättigungspunkt liegt, erfolgt die Eliminierung nach einer Kinetik nullter Ordnung, d.h. die Metabolisierungsgeschwindigkeit ist von der Konzentration der Verbindung unabhängig. Unterhalb des

Sättigungspunkts erfolgt die Metabolisierung nach einer Kinetik erster Ordnung.
Werden die metabolischen Eliminierungsgeschwindigkeiten auf die jeweiligen Substanzkonzentrationen im Gewebe bezogen, so läßt sich erkennen, daß unterhalb der einzelnen Sättigungskonzentrationen alle Substanzen mit annähernd der gleichen Eliminierungsrate metabolisiert werden. Bei niedrigen Konzentrationen der untersuchten Olefine limitiert also ein gemeinsamer Prozeß die Metabolisierungsgeschwindigkeiten. Die maximalen Geschwindigkeiten der metabolischen Eliminierung halogenierter Äthylene werden oberhalb der einzelnen Sättigungspunkte erreicht. Sie sind abhängig von der chemischen Struktur der einzelnen Verbindungen. Mit Ausnahme von Trichloräthylen nimmt mit zunehmender Anzahl von Halogensubstituenten die Metabolisierungsgeschwindigkeit ab. Vinylidenfluorid und Perchloräthylen werden extrem langsam metabolisiert.

3) Unmittelbar nach der Geburt ist bei Ratten die metabolische Kapazität für Vinylchlorid noch sehr gering, jedoch werden schon nach 8 Tagen 80 % der vollen Maximalgeschwindigkeit des Vinylchloridmetabolismus der erwachsenen Ratte erreicht.

4) Die Kinetik der Ausscheidung von Metaboliten des Trichloräthylen und des Vinylbromid im Urin der Ratte wurde untersucht und mit der des Vinylchlorid und des Tetrachlorkohlenstoff verglichen. Im Gegensatz zu Tetrachlorkohlenstoff ließen sich die Exkretionskurven der 3 Äthylene durch e-Funktionen beschreiben. Die Halbwertszeiten hiervon betrugen nur wenige Stunden. Auch ist der Prozentsatz an im Urin ausscheidbaren Metaboliten der untersuchten halogenierten Äthylene wesentlich größer als bei Tetrachlorkohlenstoff.

5) Nach Applikation von radioaktiv markiertem Vinylchlorid und Trichloräthylen konnte gezeigt werden, daß bei der Ratte in vivo markierte Metabolite irreversibel an Proteine verschiedener Organe gebunden werden. Der größte Teil kovalent an Protein gebundener Metabolite wurde in der Leber gefunden.
Das Verhältnis von kovalent an Leberprotein gebundenem Material zu der insgesamt metabolisierten Menge der jeweiligen Verbindung bleibt über einen sehr großen Konzentrationsbereich bei ganz unterschiedlichen Geschwindigkeiten der metabolischen Eliminierung konstant. Auch ließ sich nach Vorbehandlung mit Maleinsäurediäthylester keine Veränderung der Bindungsverhältnisse von Vinylchloridmetaboliten feststellen.

6) In-vitro-Versuche mit ^{14}C-Vinylbromid ermöglichten Vergleiche mit schon früher von unserer Arbeitsgruppe vorgenommenen Untersuchungen zum Stoffwechsel von Vinylchlorid und von Trichloräthylen im mikrosomalen Ansatz. Zwischen den Ergebnissen der pharmakokinetischen Untersuchungen in vivo und den in vitro erhobenen Befunden lassen sich hinsichtlich Verteilungsverhalten, Sättigungskonzentrationen und maximalen Metabolisierungsgeschwindigkeiten wesentliche Parallelen ziehen.

7) Der Stoffwechsel der untersuchten halogenierten Äthylene wurde mit Hilfe verschiedener Inhibitoren des mikrosomalen Fremdstoffmetabolismus gehemmt. Dithiocarb zeigte sich als ein außerordentlich stark wirksamer Hemmstoff des Metabolismus der untersuchten halogenierten Kohlenwasserstoffe.

8) Bei Langzeitexpositionen von Ratten in einem geschlossenen System gegenüber verschiedenen halogenierten Äthylenen (Vinylidenfluorid, Vinylchlorid, trans- und cis-Dichloräthylen, Perchloräthylen) wurde eine verstärkte Acetonabatmung beobachtet, die 40 mal höher als in gleichzeitig durchgeführten Kontrollexperimenten war.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Abanoni, S.E., Popp, J.A., Chang, S.K., Harrington, G.W., Lotlikar, P.D., Hadjiolov, D., Levitt, M., Rajalakshmi, S., Sarma, D.S.R.:
J. Nat. Cancer Inst. 58, 263 (1977)

Barbin, A., Brésil, H., Croisy, A., Jacquignon, P., Malaveille, C., Montesano, R., Bartsch, H.:
Biochem. Biophys. Res. Commun. 67, 596 (1975)

Bartsch, H. und Montesano, R.:
Mutation Res. 32, 93 (1975)

Bartsch, H., Malaveille, C., Montesano, R.:
Int. J. Cancer 15, 429 (1975)

Bini, A., Vecchi, G., Vivoli, G., Vannini, V., Cessi, C.:
Pharmacol. Res. Commun. 7, 1526 (1970)

Bolt, H.M., Kappus, H., Buchter, A., Bolt, W.:
Arch. Toxicol. 35, 153 (1976 a)

Bolt, H.M., Kappus, H., Buchter, A., Bolt, W.:
Bericht über den 16. Jahrestag der deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin e.V., A.W. Gentner Verlag, Stuttgart, 181 (1976 b)

Bolt, H.M., Kappus, H., Kaufmann, R., Appel, K.E., Buchter, A., Bolt, W.:
INSERM Symposia Series, (INSERM, Paris) 52, 151 (1976 c)

Bolt, H.M., Laib, R.J., Kappus, H., Buchter, A.:
Toxicology 7, 179 (1977 a)

Bolt, H.M., Buchter, A., Wolowski, L., Gil, D.L., Bolt, W.:
Int. Arch. Occup. Environ. Hlth. 39, 103 (1977 b)

Bolt, H.M., Filser, J.G., Wiegand, M., Buchter, A., Bolt, W.:
Arch. Hig. Rada Toksikol. (Zagreb), Suppl. 30, (1979)
im Druck

Bonse, G., Urban, Th., Reichert, D., Henschler, D.:
Biochem. Pharmacol. 24, 1829 (1975)

Bonse, G. und Henschler, D.:
CRC Crit. Rev. Toxicol. 5, 395 (1976)

Boyland, E., Chasseaud, L.F.:
Biochem. Pharmacol. 19, 1526 (1970)

Bray, G.A.:
Analyt. Biochem. 1, 279 (1960)

Buchter, A., Bolt, H.M., Kappus, H., Bolt, W.:
Int. Arch. Occup. Environ. Hlth. 39, 27 (1977)

Buchter, A., Bolt, H.M., Filser, J.G., Goergens, H.W.,
Laib, R.J., Bolt, W.:
Bericht über die 18. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin e.V., A.W. Gentner Verlag, Stuttgart, 111 (1978)

Castro, J.A., De Castro, C.R., D'Acosta, N., Díaz-Gómez,
M.J., De Ferreyra, E.C.:
Biochem. Biophys. Res. Commun. 50, 273 (1973)

Christen, H.R.:
Grundlagen der organischen Chemie, Verlag Sauerländer
Aarau/Diesterweg-Salle Frankfurt a.M., erste Auflage
(1970)

Cobby, J., Mayersohn, M., Selliah, S.:
J. Pharmacol. Exp. Ther. 202, 724 (1977)

D'Ans-Lax, E.:
"Taschenbuch für Chemiker und Physiker", Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, dritte Auflage (1967)

Deutsche Forschungsgemeinschaft:
Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten, Verlag Chemie, Weinheim (1974)

Díaz-Gómez, M.J., Castro, J.A., De Ferreyra, E.C., D'Acosta, N., De Castro, C.R.:
Toxicol. Appl. Pharmacol. 25, 534 (1973)

Fowler, J.S.L.:
Brit. J. Pharmacol. 37, 733 (1969)

Freundt, K.J., Liebaldt, G.P., Lieberwirth, E.:
Toxicology 7, 141 (1977)

Freundt, K.J. und Macholz, J.:
Toxicology 10, 131 (1978)

Garro, A.J., Guttenplan, J.B., Milvy, P.:
Mutation Res. 38, 81 (1976)

Gehring, P.J., Watanabe, P.G., Young, J.D.:
Origins of Human Cancer, Eds.: Hiatt, H.H., Watson, J.D., Winsten, J.A., Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation, Vol. 4, Cold Spring Harbor Laboratory, 187 (1977)

Gehring, P.J., Watanabe, P.G., Park, C.N.:
Toxicol. Appl. Pharmacol. 44, 581 (1978)

Gil, D.L. und Wilkinson, C.F.:
Pesticide Biochem. Physiol. 6, 338 (1976)

Green, T. und Hathway, D.E.:
Chem.-Biol. Interactions 11, 545 (1975)

Green, T. und Hathway, D.E.:
Chem.-Biol. Interactions 17, 137 (1977)

Greim, H., Schenkman, J.B., Klotzbücher, M., Remmer, H.:
Biochim. Biophys. Acta 201, 20 (1970)

Greim, H., Bonse, G., Radwan, Z., Reichert, D., Henschler, D.:
Biochem. Pharmacol. 24, 2013 (1975)

Hefner, R.E., Watanabe, P.G., Gehring, P.J.:
Ann. N.Y. Acad. Sci. 246, 135 (1975)

Hempel, V. und Remmer, H.:
Experientia 31, 680 (1975)

Henschler, D. und Bonse, G.:
Arch. Toxicol. 39, 7 (1977)

Huberman, E., Bartsch, H., Sachs, L.:
Int. J. Cancer 16, 639 (1975)

Hunter, A.L., Holscher, M.A., Neal, R.A.:
J. Pharmacol. Exp. Ther. 200, 439 (1977)

Hussain, S. und Osterman-Golkar, S.:
Chem.-Biol. Interactions 12, 265 (1976)

Jaeger, R.J., Reynolds, E.S., Conolly, R.B., Moslen, M.T.,
Szabo, S., Murphy, S.D.:
Nature 252, 724 (1974)

Jaeger, R.J.:
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 18, 83 (1977)

Jaeger, R.J., Shoner, J.G., Coffman, L.:
Env. Hlth. Perspect. 21, 113 (1977)

Jollow, D.J., Mitchell, J.R., Zampaglione, N.,
Gillette, J.R.:
Pharmacology 11, 151 (1974)

Kappus, H.:
Dissertation im Fachbereich Chemie der Universität
Tübingen (1973)

Kappus, H. und Remmer H.:
Drug Metab. Disposition 3, 338 (1975)

Kappus, H., Bolt, H.M., Buchter, A., Bolt, W.:
Nature 257, 134 (1975)

Kappus H., Bolt, H.M., Buchter, A., Bolt, W.:
Toxicol. Appl. Pharmacol. 37, 461 (1976)

Köster, U., Albrecht, D., Kappus, H.:
Toxicol. Appl. Pharmacol. 41, 639 (1977)

Köster, U., Albrecht, D., Kappus, H.:
Excerpta Medica Int. Cong. Series 440, 235 (1978)

Laib, R.J. und Bolt, H.M.:
Toxicology 8, 185 (1977 a)

Laib, R.J. und Bolt, H.M.:
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., Suppl. 297,
R22 (1977 b)

Laib, R.J. und Bolt, H.M.:
Arch. Toxicol. 39, 235 (1978)

Laib, R.J., Stöckle, G., Bolt, H.M., Kunz, W.:
Zeitschrift für Krebsforschung, im Druck (1979)

Lange, P. und Jung, F.:
Acta biol. med. germ. 27, 425 (1971)

Leybold, K. und Staudinger, HJ.:
Biochem. Z. 331, 389 (1959)

Loprieno, N., Barale, R., Baroncelli, S., Bauer, C., Bronzetti, G., Cammellini, A., Cercignali, G., Corsi, C., Gervasi, G., Leporini, C., Nieri, R., Rossi, A.M., Stretti, G., Turchi, G.:
Mutation Res. 40, 85 (1976)

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.:
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)

Malaveille, C., Bartsch, H., Barbin, A., Camus, A.M., Montesano, R., Croisy, R., Jacquignon, P.:
Biochem. Biophys. Res. Commun. 63, 363 (1975)

Maltoni, C. und Lefemine, G.:
Environ. Res. 7, 387 (1974)

Maltoni, C., Lefemine, G., Chieco, P., Carretti, D.:
Med. Lavoro 65, 421 (1974)

Maltoni, C.:
Env. Hlth. Perspectives 21, 1 (1977)

Marshall, R.S. und Wilkinson, C.F.:
Pesticide Biochem. Physiol. 2, 425 (1973)

McGann, J., Simmon, V., Streitwieser, D., Ames, B.N.:
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3190 (1975)

McKenna, M.J., Zempel, J.A., Madrid, E.O., Braun, W.H., Gehring, P.J.:
Toxicol. Appl. Pharmacol. 45, 821 (1978)

Mitchell, J.R., Jollow, D.J., Potter, W.Z., Davis, D.C., Gillette, J.R., Brodie, B.B.:
J. Pharmacol. Exp. Ther. 187, 185 (1973)

Müller, G. und Norpoth, K.:
Naturwiss. 62, 541 (1975)

Müller, G., Norpoth, K., Eckard, R.:
Int. Arch. Occup. Environ. Hlth. 38, 69 (1976)

Norpoth, K., Müller, G., Wittig, U., Gottschalk, D., Gottschalk, J.:
Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin, A.W. Gentner Verlag, Stuttgart, 16, 187 (1976)

Popper, H.:
"Primary Liver Tumors" (Falk Symposium 25), edited by Remmer, H., Bolt, H.M., Bannasch, P., Popper, H., MTP Press Limited, Falcon House, Lancaster, England, Seite 495 (1978)

Radwan, Z. und Henschler, D.:
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., Suppl. 287, R 100 (1975)

Rannug, U., Johansson, A., Ramel, C., Wachtmeister, C.A.:
Ambio 3, 194 (1974)

Rannug, U., Göthe, R., Wachtmeister, C.A.:
Chem.-Biol. Interactions 12, 251 (1976)

Reichert, D. und Henschler, D.:
Int. Arch. Occup. Environ Health 41, 169 (1978)

Reichert, D., Werner, H.W., Henschler, D.:
Arch. Toxicol. 41, 169 (1978)

Remmer, H., Greim, H., Schenkman, J.B., Estabrook, R.W.:
Methods Enzymol. 10, 703 (1967)

Rocchi, P., Prodi, G., Grilli, S., Ferreri, A.M.:
Int. J. Cancer 11, 419 (1973)

Sakaguchi, T., Nishimura, H., Masuda, K., Tsuge, I., Onishi, K., Tatsumi, H.:
Biochem. Pharmakol. 15, 756 (1966)

Schaffner, F.:
"Primary Liver Tumors" (Falk Symposium 25), edited by Remmer, H., Bolt, H.M., Bannasch, P., Popper, H., MTP Press Limited, Falcon House, Lancaster, England, Seite 189 (1978)

Scheulen, M., Kappus, H., Bolt, H.M.:
"Microsomes and Drug Oxidations", editors: Ullrich, V., Roots, I., Hildebrandt, A., Estabrook, R.W., Conney, A.H., Pergamon Press, Oxford-New York-Toronto-Sydney-Paris-Frankfurt, Seite 661 (1977)

Shank, R.C.:
Toxicol. Appl. Pharmacol. 31, 361 (1975)

Sharkey Jr., A.G., Schultz, J.L., Friedel, R.A.:
Anal. Chem. 28, 934 (1956)

Siegers, C.-P. und Strubelt, O.:
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Suppl. 287, R 103 (1975)

Siegers, C.-P., Strubelt, O., Schütt, A., Völpel, M.:
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., Suppl. 293, R 66 (1976)

Spiteller, M. und Spiteller, G.:
"Massenspektrensammlung von Lösungsmitteln, Verunreinigungen, Säulenbelegmaterialien und einfachen aliphatischen Verbindungen", Springer-Verlag Wien-New York (1973)

Staab, H.A.:
"Einführung in die theoretische organische Chemie", Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße, 4. Aufl. (1966)

Strubelt, O., Siegers, C.-P., Schütt, A.:
Arch. Toxicol. 33, 55 (1974)

Sunderman, F.W.:
Amer. J. Med. Sci. 253, 107 (1967)

Uehleke, H., Hellmer, K.H., Tabarelli, S.:
Xenobiotica 3, 1 (1973 a)

Uehleke, H., Hellmer, K.A., Tabarelli-Poplawski, S.:
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 279, 39 (1973 b)

Uehleke, H. und Werner, T.:
Arch. Toxicol. 34, 289 (1975)

Uehleke, H., Poplawski, S., Bonse, G., Henschler, D.:
Xenobiotica 7, 94 (1977)

Van Duuren, B.L.:
Ann. N.Y. Acad. Sci. 246, 258 (1975)

Van Duuren, B.L. und Banerjee, S.:
Cancer Res. 36, 2419 (1976)

Van Dyke, R.A. und Wood, C.L.:
Drug Metab. Dispos. 3, 51 (1975)

Watanabe, P.G., McGowan, G.R., Gehring, P.J.:
Toxicol. Appl. Pharmacol. 36, 339 (1976 a)

Watanabe, P.G., McGowan, G.R., Madrid, E.O., Gehring, P.J.:
Toxicol. Appl. Pharmacol. 37, 49 (1976 b)

Watanabe, P.G., Hefner, R.E., Gehring, P.J.:
Toxicology 6, 1 (1976 c)

Watanabe, P.G., Zempel, J.A., Pegg, D.G., Gehring, P.J.:
Toxicol. Appl. Pharmacol. 44, 571 (1978)

Weisburger, E.K.:
Env. Hlth. Perspectives 21, 7 (1977)

Wilkinson, C.F.:
Pesticide chemistry (ed. A.S. Tahori), Proc. 2nd. Internat. Congr. Pest. Chem. N.Y.: Gordon & Breach, Seite 117 (1971)

Wilkinson, C.F., Brattsten, L.B.:
Drug Metab. Rev. 1, 153 (1972)

Wilkinson, C.F., Hetnarski, K., Hicks, L.J.:
Pesticide Biochem. Physiol. 4, 299 (1974)

Lebenslauf

Am 24. August 1947 wurde ich als zweites von vier Kindern des Internisten Dr. Bernhard Filser und der Ärztin Dr. Gertrud Filser in München geboren.
1951 übersiedelte meine Familie nach Enkenbach/Pfalz. Dort besuchte ich von 1954 bis 1958 die Volksschule. Von 1958 bis 1966 war ich Schüler des Altsprachlichen Gymnasiums in Kaiserslautern, wo ich im Herbst 1966 die Reifeprüfung ablegte.
Im Wintersemester 1966/67 nahm ich an der Universität Tübingen das Studium der Biochemie auf. Den ersten Teil der Diplom-Vorprüfung legte ich im Wintersemester 1967/68, den zweiten Teil im Wintersemester 1971/72 und den mündlichen Teil der Diplomprüfung im Wintersemester 1974/75 ab. Anschließend fertigte ich eine Diplomarbeit an über das Thema "Synthese, Reduktion und Reoxydation eines über Gly A1 und Lys B29 überbrückten Insulins" unter Anleitung von Prof. Dr. U. Weber am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen.
Von September 1976 bis Dezember 1978 arbeitete ich an meiner Dissertation "Pharmakokinetik und Metabolismus halogenierter Äthylene" unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. H.M. Bolt am Institut für Toxikologie der Universität Tübingen.

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Herren Professoren und Dozenten:
Physiologische Chemie und Biochemie: Weitzel, Flohé, Guglielmi, Hörnle, Mecke, Probst, Weber, Wendel, Wenck, Weser; Anorganische Chemie: Rüdorff, Krug, Stumpp; Organische Chemie: E. Müller, Bayer, Kraus, Opitz, Rieker; Physikalische Chemie: Kortüm, Mauser, Oelkrug, Rau; Mikrobiologie: Zähner, Diekmann, Pape, Wolf; Pflanzenphysiologie: Schwemmle, Wegmann; Genetik: Seyffert, Meyer, Pelling; Pharmakologie: Remmer, Bolt; Anatomie: Mörike; Botanik: Metzner; Physik: Krüger; Zoologie: Möhres, Schwartz; Mathematik: Schweizer; med. Strahlenkunde: Feine, Kallee.